

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
BIOFÜÜSIKA JA TAIMEFÜSIOLOOGIA ÕPPETOOL

Silja Erg

**Fotosünteesiliste kromoproteiinide uuring kõrge hüdrostaatilise rõhu all kasutades  
valguomaseid optilisi markereid**

Magistritöö (30 EAP)

Juhendajad professor Arvi Freiberg, DSci, PhD

teadur Liina Kangur, PhD

vanemteadur Kõu Timpmann, PhD

TARTU 2020



## Infoleht

### Fotosünteesiliste kromoproteiinide uuring kõrge hüdrostaatilise rõhu all kasutades valguomaseid optilisi markereid

Töös uuriti tertsiaarsete vesiniksidemete katkemist fototroofse *Rhodobacter sphaeroides* valgust koguvas pigment-valgu kompleksis LH2 hüdrostaatilise kõrge rõhu toimetel. Töös kasutati UV-IR spektroskoopiat ning trüptofaani ja bakterklorofüllü molekule kui apoproteiini ja valgu pigmentset alasüsteemi iseloomustavaid optilisi markereid. Töös saadud tulemused kinnitavad vesiniksidemete katkemist umbes 4 kbar (0,4 GPa) juures, rõhu kasvades järjest süveneva valgu solvatatsiooni tulemusel.

**Märksõnad:** fotosünteesilised membraanikompleksid, tertsiaarsed vesiniksidemed, trüptofaan, hüdrostaatiline kõrge rõhk, UV-IR spektroskoopia

**CERCS klassifikaatorid:** P230 Aatomi- ja molekulaarfüüsika, P330 Bioenergeetika

### Intrinsic optical markers in high hydrostatic pressure perturbation research of photosynthetic chromoproteins

Protein spectroscopy is informative, but presents a number of difficulties and needs development. Protein-ligand tertiary hydrogen bond breakage was researched, induced by hydrostatic pressure perturbation and monitored by ultraviolet-infrared spectroscopy. A novel method was being developed, which proved to be successful at least up to 11 kbar (1,1 GPa) and allowed the use of 290 nm UV-excitation without the loss of signal and photodegradation. Chromoprotein samples were two LH2 type light harvesting antennae from CrtC- *Rhodobacter sphaeroides* as the main subject with detectable pressure perturbed hydrogen bonding and WT *Thermochromatium tepidum* for negative control. Previously known spectral irregularity of a ligand marker B850 was found to correlate with the newly researched intrinsic tryptophan spectra, both patterns emerging at 4 kbar (0,4 GPa), providing proof of hydrogen bond rupture and the cause of it being increasing solvation of hydrophobic cavities of the chromoprotein during pressure perturbation.

**Keywords:** photosynthetic membrane complexes, tertiary hydrogen bonds, tryptophan, high hydrostatic pressure, UV-IR spectroscopy

**CERCS classifiers:** P230 Atomic and molecular physics, P330 Bioenergetics

# Sisukord

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INFOLEHT .....</b>   | <b>3</b>  |
| <b>SAGEDAMINI KASUTATUD LÜHENDID .....</b>  | <b>6</b>  |
| <b>1 SISSEJUHATUS .....</b>   | <b>8</b>  |
| <b>2 KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....</b>  | <b>10</b> |
| 2.1 Fototroofsete bakterite valgust koguvad kromoproteiin antennkompleksid .....        | 10        |
| 2.2 Töös kasutatud purpurbakterite valgust koguvad antennid .....                       | 11        |
| 2.2.1 <i>Rhodobacter sphaeroides</i> mutantne CrtC- LH2 antenn .....                    | 11        |
| 2.2.2 <i>Thermochromatium tepidum</i> metsiktüüpi LH2 antenn .....                      | 12        |
| 2.3 Antennide valgusenergia migratsioon kujundab markerite spektreid .....              | 14        |
| 2.3.1 Bakteriklorofüllide omavahelisest asetusest oleneb valgushaarde olemus .....      | 14        |
| 2.3.2 Ergastuse relaksatsioonirajad on antennides reguleeritud valkude poolt .....      | 16        |
| 2.4 Optilised markerid .....  | 18        |
| 2.4.1 Antennid on valgustundlikud ultravioletist kuni lähi-infrapunasele .....          | 18        |
| 2.4.2 Trüptofaan optilise markerina .....   | 20        |
| 2.4.3 Vesiniksidemete katkemise mõju bakteriklorofüllide ja trüptofaani spektritele ... | 23        |
| 2.5 Rõhu kaudu vesiniksidemetes häirete esile kutsumine .....                           | 26        |
| 2.6 Detergendimitsell stabiliseerib membraanvalke vesilahuses .....                     | 28        |
| 2.7 Antennide uurimise rakenduslik huvi .....   | 29        |
| <b>3 TÖÖ EESMÄRK JA HÜPOTEESID .....</b>  | <b>31</b> |
| <b>4 MATERJAL JA METOODIKA .....</b>  | <b>33</b> |
| 4.1 Uuritavad proovid ja kasutatud kemikaalid .....                                     | 33        |
| 4.2 Seadmed ja tarvikud .....   | 36        |
| 4.2.1 Teemantalasi-rõhurakk .....   | 36        |
| 4.2.2 Barospektroskoopiline mõõteseade .....  | 38        |
| 4.3 Andmete analüüs ja metoodilisi märkusi .....  | 40        |
| 4.3.1 Andmete analüüs .....   | 40        |
| 4.3.2 Täiendavaid metoodilisi märkusi .....   | 43        |
| <b>5 TULEMUSED JA ARUTELU .....</b>   | <b>46</b> |
| 5.1 Bakteriklorofüllidega seotud lähi-infrapuna neeldumine LH2 antennides .....         | 46        |
| 5.1.1 Spektrite kirjeldus normaalingimustel .....                                       | 46        |
| 5.1.2 Neeldumisspektrite rõhusõltuvus .....   | 48        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 5.2      | Trüptofaaniga seotud ultravioletne kiirgus LH2 antennides.....                   | 51        |
| 5.2.1    | Trüptofaani fluorestsentsispektrid normaalingimustel.....                        | 51        |
| 5.2.2    | Fluorestsentsispektrite rõhusõltuvus .....                                       | 52        |
| 5.2.3    | Trüptofaani kiirgusspektrite mõõtemääramatus ja reprodutseeritavus .....         | 55        |
| 5.3      | Trüptofaani kiirguse ja bakterklorofüllü neeldumise rõhusõltuvuste võrdlus ..... | 57        |
| 5.4      | Objektide stabiilsus ja taastumine pärast rõhutsüklit.....                       | 60        |
| 5.4.1    | Lähi-infrapuna spektrid.....   | 60        |
| 5.4.2    | Ultravioletsed spektrid .....  | 61        |
| 5.5      | Katselise töö tulemused ja edasiste uuringute perspektiivid .....                | 63        |
| <b>6</b> | <b>KOKKUVÕTE.....</b>  | <b>65</b> |
|          | <b>INTRINSIC OPTICAL MARKERS IN HIGH HYDROSTATIC PRESSURE</b>                    |           |
|          | <b>PERTURBATION RESEARCH OF PHOTOSYNTHETIC CHROMOPROTEINS.....</b>               | <b>66</b> |
| <b>7</b> | <b>TÄNUAVALDUSED .....</b>   | <b>68</b> |
| <b>8</b> | <b>KASUTATUD KIRJANDUS .....</b>   | <b>69</b> |
|          | <b>LISA 1. FLUORESTSEERUVAD AMINOHAPPEJÄÄGID LH2 POLÜPEPTIIDIDES...</b>          | <b>84</b> |
|          | <b>LISA 2. BAROSPEKTROSKOOPILINE SEADE .....</b>                                 | <b>86</b> |
|          | <b>LISA 3. LIHTLITSENTS .....</b>  | <b>88</b> |

## Sagedamini kasutatud lühendid

### Optilised markerid ja nende interaktsioon

|        |   |
|--------|---|
| BChl a | bakterklorofüll a; tekstis ka ligand ja pigment   |
| B800   | bakterklorofüllide 800-nm neeldumisriba, ka B800 oligomeeri nimetus   |
| B850   | bakterklorofüllide 850-nm neeldumisriba, ka B850 oligomeeri nimetus   |
| Trp, W | trüptofaan, valguahela üks aromaatsetest aminohappejääkidest, tuntud valgusisene fluorestseeruv kromofoor UV-piirkonnas |

### Tertsiaarsed interaktsioonid

|        |  |
|--------|--|
| H-side | vesinikside, antud töö kontekstis enamasti antennivalgu Trp või Tyr ja ligandi ehk B850 bakterklorofüllide vaheline tertsiaarne H-side |
|--------|--|

### Proovimaterjaliga seotud lühendid

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <i>Rba. sphaeroides</i> / <i>Rba.</i> | <i>Rhodobacter sphaeroides</i> , endine <i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i> ; mesofiilne fotosünteesiv purpurbakter; laialt kasutatav fotosünteesi mudelorganism |
| CrtC                                  | ingl <i>acyclic carotenoid 1,2-hydratase</i> ; atsükliline karotenoidi 1,2-hüdrataas; purpurbakterite karotenoidide sünteesiraja ensüüm                          |
| <i>Tch. tepidum</i> / <i>Tch.</i>     | <i>Thermochromatium tepidum</i> , endine <i>Chromatium tepidum</i> ; termofiilne fotosünteesiv purpurbakter  |
| WT                                    | ingl <i>wild type</i> , metsiktüüpi genoomiga  |

## Kromoproteiinid

|     |  |
|-----|--|
| LH1 | ingl <i>light-harvesting complex 1</i> , valgust koguv kompleks 1, keskne antennkompleks, mis ühenduses reaktsioonitsentriga (RC) moodustab tuumkompleksi LH1-RC |
| LH2 | ingl <i>light-harvesting complex 2</i> , valgust koguv kompleks 2; perifeerne antennkompleks   |
| RC  | ingl <i>reaction centre</i> , fotokeemiline reaktsioonitsenter, mis salvestab antennide poolt kogutud valgusenergiat laengute eraldamise teel                    |

## Spektritega seotud terminid ja ühikud

|                  |   |
|------------------|---|
| UV-IR            | UV ingl <i>ultraviolet</i> , ultravioletne, antud töös viitab 200...400 nm spektri osale<br>IR ingl <i>infrared</i> , infrapunane, antud töös viitab 750...1000 nm spektri osale  |
| $\lambda_{\max}$ | spektririba maksimumi asukoht (lainepikkus, nm)   |
| nm               | nanomeeter, lainepikkuse ( $\lambda$ , lambda) mõõtühik   |
| $\nu_{\max}$     | spektririba maksimumi asukoht (üleminekuenergia, $\text{cm}^{-1}$ )   |
| $\text{cm}^{-1}$ | pöördsentimeeter, ingl <i>inverse centimeter</i> , spektroskoopias laialdaselt kasutatav footoni energia mõõtühik: $E=h\nu=hc/\lambda$ , mis on pöördvõrdeline valguse lainepikkusega $\lambda$ (h tähistab Plancki konstant, $\nu$ sagedust, c valguse kiirust vaakumis) |
| sininihe         | lainepikkus lüheneb; vastavalt valemile $\nu \lambda = c$ tähendab see, et footoni energia/sagedus kasvab   |
| punanihe         | lainepikkus kasvab ehk energia väheneb  |
| FWHM             | ingl <i>full width at half maximum</i> , spektririba täislaius poolel kõrgusel; tekstis riba laius  |

# 1 Sissejuhatus

Valitseb üsna üksmeelne arvamus selle kohta, et fotosünteesilistes antennides moodustavad valgud pigmentide ümber maatriksi, mis hoiab pigmente optimaalseks toimimiseks sobilikus asendis ja vastastikmõjudes (Fowler jt., 1995; Adolphs ja Renger, 2006; Brotsudarmo jt., 2009; Lüer jt., 2015; Niedzwiedzki jt., 2018). Valkude mõjul reguleeritakse antennkompleksides valguse kogumise efektiivsust, fotoergastuste ülekande aega ja suunda ning laengute lahutamise kiirust (Harel ja Engel, 2012).

Seevastu pole veel palju uuritud, kuidas pigmendid valgumaatriksit mõjutavad ning kuidas neid mõjutusi valguomaste markeritega tuvastada. Samas on teada, et fotosünteesiliste pigmentide varieeruvus on eri organismide vahel lai, alates klorofülliderivaatidest kuni suure varieeruvusega karotenoidideni. Kõigele lisaks on karotenoidide osas viimasel ajal järjest rohkem välja toodud erinevaid vaatenurki nende mõju osas (Poliak jt., 2018; Boehm jt., 2020). Valgulise ümbruse lähema tähelepanuta jätmine on osaliselt mõistetav, sest nende uurimine võrreldes pigmentidega on tehniliselt veidi keerukam (vt allpool), ning seadmete ning meetodika kokkupanek võtab mõned aastad aega. Kuigi seadmete komponendid on praeguseks ka juba kommertsiaalselt kättesaadavad, siis suur osa optilistest katseseadmetest on vajalik ise ehitada (Roche ja Royer, 2018). Valgumaatriksi süvauuringute puhul on hetkeseisuga lisatahistuseks, et ainult väheste antennide struktuur on piisava atomaarse lahutusega teada (Koepeke jt., 1996; McDermott jt., 1995; Niwa jt., 2014; Yu jt., 2018a; Shi jt., 2015; RCSB Protein Data Bank). Kuna looduslike ning mutageensete valkude stabiilsuse uuringud ning kristallograafia uuringud on üksteist toetavad, siis nii geenitehnoloogia, biokeemia kui biofüüsika paralleelne areng on valkude energieetika uurimisel oluline.

Antud töö põhieesmärgiks oli valk-pigment vastastikmõjude tuvastamine ja nende olemuse uurimine kõrgrõhu-häiritus spektroskoopiat kasutades. Töö katseliseks eripäraks oli erinevate valgusiseste optiliste markerite kasutamine, millest ühed iseloomustavad valgusiseseid pigmente (B800, B850) ja teised valgulist ümbrust (Trp). Teiseks meetodika eripäraks oli antenni kromoproteiinide omaduste mitteinvasiivne mõjutamine väliselt rakendatud hüdrostaatilise rõhu poolt. Spektroskoopilised meetodid on tuntud kõrge tundlikkuse ja selektiivsuse poolest, mis ühtlasi tagab nende hea (suurusjärgus 0,1 nm; Allen, 2009) ruumilise lahutuse valitud kromofooride suhtes. Töös rakendatud rõhud, mis ulatusid ~10 kbar, kvalifitseeruvad biofüüsikas kõrgete rõhkude hulka. Nende rõhkudega seotud energia on piisav nõrkade molekulide-vaheliste



interaktsioonide mõjutamiseks, kuid väga väike võrreldes tugevate molekulide-siseste keemiliste sidemete energiaga. Just seda kvalitatiivset asjaolu oleme oma töös ulatuslikult ekspluateerinud.

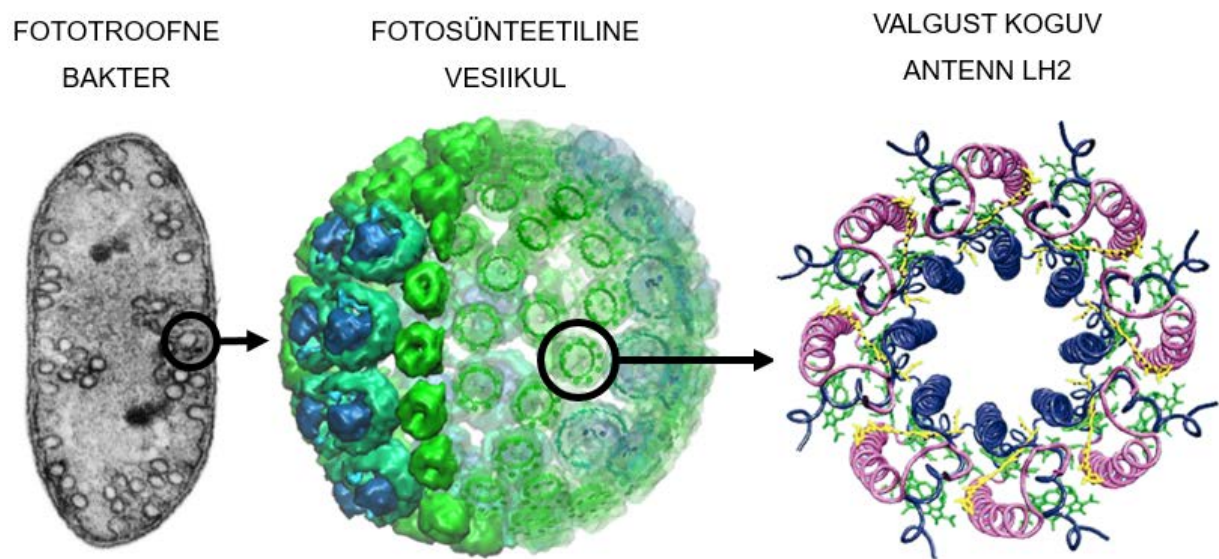
Varasemad TÜFI biofüüsika grupis tehtud uuringud (Kangur jt., 2008a; Kangur jt., 2012) erinevate antennidega on näidanud valk-pigment interaktsioonides tertsiaarsete vesiniksidemete (H-sidemete) katkemist kõrge hüdrostaatilise rõhu all. Sidemete katkemiseks rõhu toimel on mitmeid võimalusi, kuid selle täpne mehhanism on seni jäänud välja selgitamata. Selle probleemi lahendamine saigi käesoleva töö konkreetseks eesmärgiks.

Töö toimus Tartu Ülikooli füüsikainstituudis, biofüüsika laboris.

## 2 Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Fototroofsete bakterite valgust koguvad kromoproteiin antennkompleksid

Fotosünteesi käimalükkamiseks on esmalt vaja toorest Päikeseenergiat väliskeskkonnast rakku koguda ja selleks on fototroofsetel organismidel valkudest ja ligand-pigmentidest evolutsiooni käigus tekkinud spetsiifilised kromoproteiinid - valgust koguvad (LH, *light harvesting*) antennid (Cogdell ja Thornber, 1980; Ke, 2003). Bakterid on võrreldes taimedega vähem tuntud fototroofid, kuid samamoodi teaduslikku põnevust pakkuvad nii fundamentaalsete kui Päikeseenergeetika praktiliste teadmiste osas. Purpurbakterite valgust koguvaid antenne kasutatakse fotosünteesi põhimõtete uurimise mudelina sageli, sest nende fotosüsteemid on kõrgemate organismide kõrval võrdlemisi lihtsad, ning komponentide selge spektraalne lahutuvus on kvantbioloogiliste uuringute võtmes suureks eeliseks (Saer ja Blankenship, 2017).



**Joonis 1. (Mugandatud)** Vasakul on purpurbakter, milles on rohkelt fotosünteesilisi vesiikuleid ehk kromatofore (Kis, 2014). Roheliselt on kujutatud fotosünteesilise vesiikuli atomaarse resolutsiooniga struktuur, mille membraanis eraldiseisvad erkrohelised ringid on LH2 antennid, suuremad sinakasrohelised ringid on LH1 antennid, mille keskel asuvad tumesinised reaktsioonitsentrid (Şener jt., 2010). Paremal asuv LH2 struktuur on oktameerne, kuid antennide oligomeersus varieerub, eriti liigiti (Koepeke jt., 1996).

Purpurbakterite antennid asuvad fotosünteesilise vesiikuli ehk kromatofoori membraanis, mis on invagineerunud rakumembraanist fotosünteesilise kasvufaasi ajal ning küllastunud valgust koguvate antennkompleksidega. Şener jt. konstrueerisid 2007. a eelnevate kirjelduste baasil *Rba. sphaeroides* näitel kromatofoori atomaarse mudeli (Joonis 1), millelt on näha, et selle vesiikuli membraanis on ringikujulisi valgust koguvaid antenne rohkearvuliselt ning neist kõige arvukamad on eraldiseisvad LH2 tüüpi perifeersed antennkompleksid. LH2 tüüpi kromoproteiinid koguvad valgusenergiat ja annavad selle edasi keskele reaktsioonitsentriga seotud antennile LH1-RC (RC, *reaction center*), kus toimub laenguta lahutamine (Croce jt., 2018). Käesolev töö keskendub LH2 antennidele.

## **2.2 Töös kasutatud purpurbakterite valgust koguvad antennid**

### **2.2.1 *Rhodobacter sphaeroides* mutantne CrtC- LH2 antenn**

Purpurbakteri *Rba. sphaeroides* (end. *Rhodopseudomonas sphaeroides*) neurosporeeni mutandi, CrtC- antenne on optilistes rõhu-häirituse uuringutes kasutatud võrdlemisi pikalt, alates tüve loomisest (Coomber jt., 1990). Põhjenduseks võib olla, et mutantide kontekstis on sel lisaks komponentide spektraalsele lahutuvusele ka kõrge vastupidavus ekstreemsele hüdrostaatilisele rõhule, mis sai kinnitust antud töös ning vastab varasemalt leitud (Kangur jt., 2012) ning samas esineb selle spektris omapäraseid nähtusi, nagu ka antud töös uuritav H-sidemete katkemine.

Coomber ja kolleegide 1990. a identifitseeritud karotenoidide sünteesiraja lugemisraamides (*crtA* – *crtF*, *crtI*, *crtK*) on Tn5 insertiooniga inaktiveeritud *crtC* ja karotenoidide sünteesi lõpule viimiseks vajalik ensüüm CrtC (atsükliline karotenoidi 1-2-hüdrataas), mistõttu kuhjub mutantsetes antennides sünteesiraja vaheproduktiks olev karotenoid neurosporeen (Lang jt., 1995). Antud mutandi uuringutes on olulisel kohal metsiktüübiga võrreldes madalam H-sidemete katkemise aktivatsioonienergia (Kangur jt., 2012), tänu millele on uuringuid võimalik läbi viia madalamal rõhul, mis vähendab tehnilist keerukust. Rõhu-häirituse meetodika kasutamisel oluliseks omaduseks, et uuritavas kromoproteiinis oleks võimalik H-sidemeid de- ja renatureerida ilma kogu antenni lõhkumata.

Purpurbakterite mutantsete antennide loomine on olnud üheks pikka aega kasutatavaks meetodikaks stabiilsuse ja energiaülekanne spektroskoopias (Jones jt., 1992; Fowler jt., 1994; Kangur jt., 2012; Flanagan jt., 2019), viimatiseks lisanduseks valdkonna meetodikatesse on võimalusterohke CRISPR/cas9 (Ribeiro jt., 2018; Mougiakos jt., 2019; Luo jt., 2020) või siis

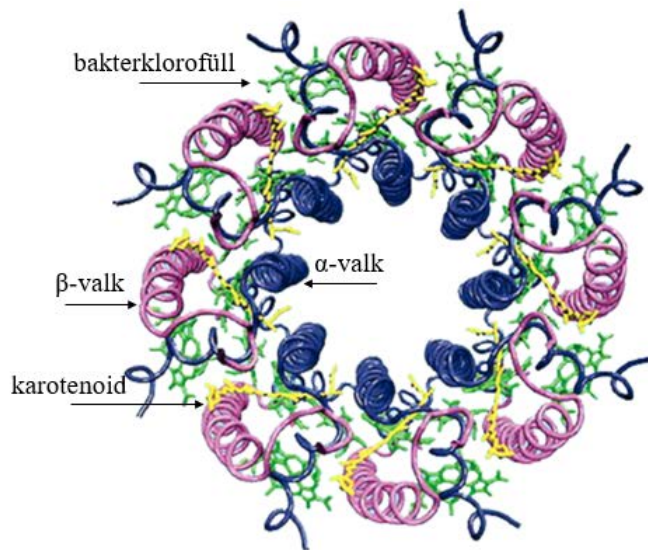
bakterite enda endogeense CRISPR/cas kasutamine fotofüüsikaliste uurimisobjektide loomiseks (Baker jt., 2019). Bakteriaalsete fotosüsteemide uurimiseks on spektroskoopias kasutatud modifikatsioone, mis mõjutavad spektritel väljenduvald pigment-pigment ja pigment-valk interaktsioone H-sidemete võrgustiku muutuste tõttu (Fowler jt., 1994), antennide hübridiseerimise toimet tekkiva neeldumise võimendumise tõttu (Swainsbury jt., 2017a). Uuringutes on kasutatud pigmendi vahetusi kas sidumistasku afiinsuse spetsiifika muutmisega näiteks muutes BChl sidumistasku mittespetsiifiliseks BChl ja Chl suhtes (Swainsbury jt., 2019) või siis erinevate karotenoide radade muutusi (Coomber jt., 1990; Lang jt., 1995; Chi jt., 2015).

Kuna pigmentidel on antennides lisaks valguse kogumise ja ergastuse kiire ülekande funktsioonile ka kriitiline struktuurne roll (Jones jt., 1992), siis kromoproteiini ligandiks olevate pigmentide asendamine on üks praktiliselt kasutuses olevatest meetoditest, uurimaks kofaktori ja valgumaatriksi vahelisi interaktsioone ja nende vastastikust mõju kompleksi stabiilsusele ja funktsioneerimisele.

### **2.2.2 *Thermochromatium tepidum* metsiktüüpi LH2 antenn**

Töös kasutati paralleelselt ka metsiktüüpi *Thermochromatium (Tch.) tepidum* (end. *Chromatium tepidum*) isoleeritud LH2 antennkompleksi. Yellowstone'i vulkaanilistest kuumaveeallikatest isoleeritud 48-50 °C kasvuoptimumiga *Tch. tepidum* on teadaolevalt kõige termofiilsem fotosünteesiv purpurbakter (Madigan, 1984; Kimura jt., 2017) ning tema LH2 omapäraks on kõrge termodünaamiline stabiilsus. Termofiilse *Tch. tepidum* ja mesofiilse *Rba. sphaeroides* LH2 antenni võrreldes leiti, et mesofiili LH2 lagunes +55 °C kraadi juures ning signaal kadus, kuid termofiili puhul energiaülekanne jätkus (Shi jt., 2015). Samuti pole see seni kasutatud ekstreemsete rõhkude survele ei ole antud liigi antennide H-sidemete katkemist täheldatud (Kangur jt., 2020) ja selle kõige tõttu valiti *Tch. tepidum* LH2 antenn H-sidemete katkemise suhtes negatiivseks kontrolliks.

Kuigi *Tch. tepidum* kesksest LH1-RC kompleksist koostati 3 Å lahutuvusega struktuur juba 2014. a (Niwa jt., 2014) ning 2018. a jõuti ka 1,9 Å täpsuseni (Yu jt., 2018a), siis LH2 kristallograafilist struktuuri pole 2020. a. seisuga lahendatud (Shi jt., 2015; RCSB Protein Data Bank). Seetõttu lähtutakse LH2 kujutamisel sarnaste liikide struktuuridest - *Tch. tepidum* LH2 analoogina on välja pakutud *Phaesporillum molichianum* LH2 (Joonis 2), sest need sarnanevad biokeemiliselt ja spektroskoopiliselt (Koepke jt., 1996; Shi jt., 2017; Kangur jt., 2020).



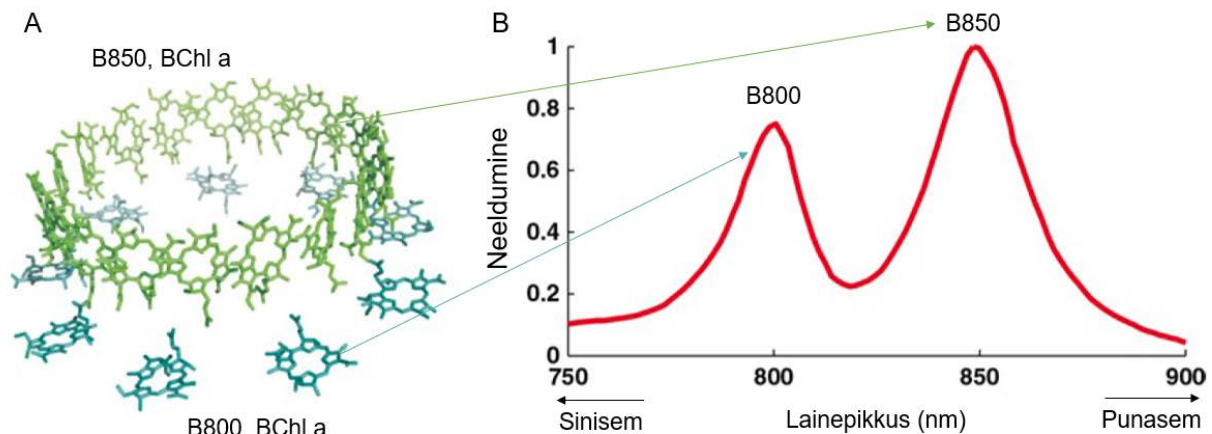
**Joonis 2.** (Mugandatud) *Phaeospirillum molischianum* (sünonüüm *Rhodospirillum molischianum*) LH2 kompleksi struktuur (Koepke jt., 1996). Arvatavalt sarnane *Tch. tepidum* LH2 struktuuriga. Kompleks koosneb 8 omavahel seotud subühikust, mis membraani tasandil moodustavad suletud ringi. Subühik koosneb ühest transmembraanses  $\alpha$ -polüpeptiidist (tumelilla), ühest transmembraanses  $\beta$ -polüpeptiidist (roosa) ning kolmest BChl a (1 B800, 2 B850; roheline) ja ühest karotenoidi (kollane) molekulist.

Võrreldes kahte töös uuritud bakteriliiki, *Tch. tepidum* ja *Rba. sphaeroides*, on mõlema iseloomulikuks valgust koguvaks pigmendiks BChl a (Madigan, 1984) ning LH2 tüüpi antennide BChl a tugevaim neeldumine toimub ~800 ja ~850 nm juures (nimetusega B800, B850). Spektraalseks erinevuseks on leitud, et *Tch. tepidum* LH2 B800 ja B850 ribad on palju mittehomoogeensemad, kui *Rba. sphaeroides* ning selgituseks on pakutud, et *Tch. tepidum* LH2 struktuur võib olla paindlikum ning sisaldada erinevaid  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidide variantide kombinatsioone (Shi jt., 2015). BChl neeldumise häälestamisel on oluline roll H-sidemete võrgustikul, mis tekib BChl ning polüpeptiidide vahel (Saer ja Blankenship, 2017). *Tch. tepidum* LH2 valgumaatriksi moodustavate  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidide erisused ning sellest tulenevad H-sidemete võrgustiku erisus võib tõenäoliselt olla antud kompleksi suurenenud termotabiilsuse aluseks (Kangur jt., 2020).

## 2.3 Antennide valgusenergia migratsioon kujundab markerite spektreid

### 2.3.1 Bakterklorofüllide omavahelisest asetusest oleneb valgushaarde olemus

Antud töös uuritavates valgust koguvates antennides on peamiseks pigmendiks bakterklorofüll a (BChl a), millest tekib neeldumisspektrisse erinevaid maksimume, vastavalt paigutusest tulenevale üleminekuenergia vähenemisele - Soret,  $Q_x$ , B800 ( $Q_y$ ) ja B850 ( $Q_y$ ). Bakterklorofüllil on monomeerina neeldumisriba ( $\lambda_{\max} \sim 770$  nm), samas omapärase paiknemisega tsüklilistes oligomeerides (Joonis 3.A) tekivad kvantkoherentsed kollektiivse ergastuse eksitoonsed neeldumisribad ( $\lambda_{\max} \sim 800$  ja 850 nm) (Demmig-Adams jt., 2014). Eksitoonsed BChl oligomeerid on monomeeriga võrreldes punanihkes, ning lisaks on teada ka, et rõhu surveleksitoninteraktsioonide tugevnemisel punanihe suureneb veelgi (Pajusalu jt., 2019).



**Joonis 3. (Mugandatud) *Rba. sphaeroides* LH2 valgust koguva antenni bakterklorofülle sisaldav osa (A) ja neile vastav IR neeldumisspekter (B). Näha on kaks bakterklorofüllidest moodustunud ringi B800 (sinine) ja B850 (roheline). Tihedalt kokku pakitud B850 ringis interakteeruvad ergastatud bakterklorofüllid üksteisega tugevalt, moodustades kollektiivse ergastatud seisundi e eksitoni. Eksitonefektid üksteisest kaugel asuvate, seega nõrgas vastasmõjus olevate B800 bakterklorofüllide vahel (samuti B800- ja B850-BChl a vahel), on antud töö seisukohalt ebaolulised (Demmig-Adams jt., 2014).**

Kollektiivsed pikalt kestvad ergastused on toatemperatuuril olevates bioloogilistes kompleksides erakordne, sest varem arvati, et tavaliselt külmade ja kõvade süsteemidega seostatud kvantefektid ei saa nii soojades ja pehmetes süsteemides olulist rolli mängida (de la Lande jt., 2015; Chandrasekaran, 2019). Samas on erinevates töödes leitud tõendeid, et antennides toimub niivõrd efektiivne kvantide kogumine ja kiire ülekanne, et seda oleks raske ilma kvantsidususega

põhjendada (Brixner jt., 2005; Lee jt., 2007; Engel jt., 2007; Scholes, 2010; Strümpfer jt., 2012; Harel ja Engel, 2012; Pajusalu jt., 2019; Cao jt., 2020). Harel ja Engel tõestasid 2012. a eksperimentaalselt seda ka purpurbakterite LH2 antennis olevate B800 ning B850 pigmendi oligomeeride osas. LH2 B850 on tüüpiline näide eksitoonse ergastuse delokaliseerumisest fotosünteetilistes kompleksides, antenni 27 bakteriklorofüllist 18 on paigutunud B850 ringiks, mis jagavad ergastust väga efektiivselt, muutes neeldumissaidi energia madalamaks (Cogdell jt., 2006; Pajusalu jt., 2019). Leitud on ka tõestus, et eksitoninterakstiooni tekib elusrakkudes (Freiberg jt., 2013) ning võib tekkida ka mitme LH2 antenni vahel (Schroeder jt., 2015).

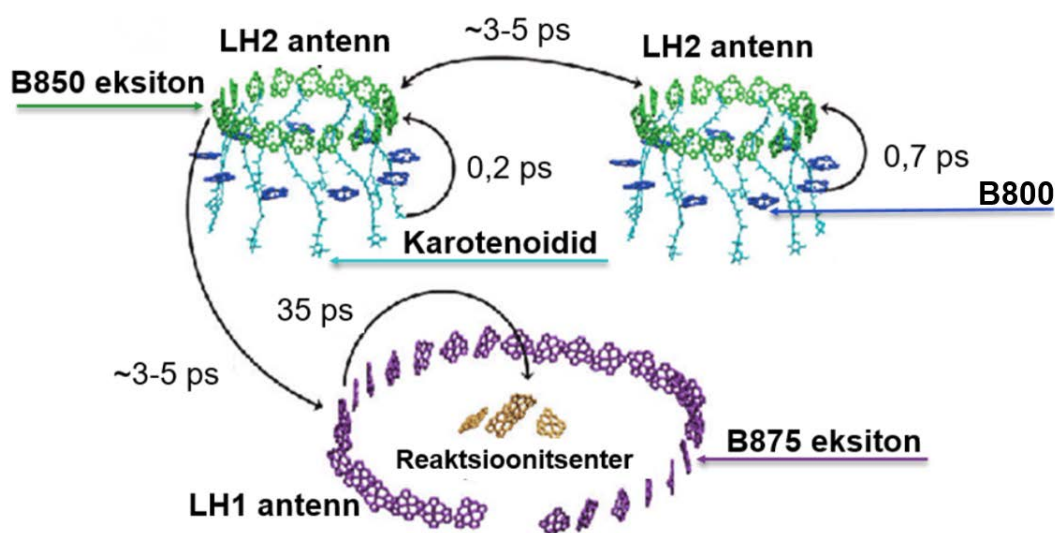
Teine ülekande tüüp ja klassikaline mittekoherentne energia levik, Försteri resonantne energiaülekanne FRET (Förster, 1948; van Grondelle jt., 1994) on sageli kujutatud kvantenergia „hüpetena“, kus ergastus liigub doonor-kromofoorilt aktseptorile (Ishizaki ja Fleming jt., 2009).

Fotosünteetilises valguse kogumises on kombineeritud mõlema kiirusega energiaülekanded, purpurbakterite LH2 kontekstis, B800->B850 ülekannet iseloomustab eelkõige FRET, ning B850 sisest ülekannet kvantsidusus (Strümpfer jt., 2012). See selgitab, miks hõredamalt paiknevate valgust koguvate pigmentide spektrid erinevad tihedatest oligomeeridest.

Valguline maatriks on see, mis pigmentide asetust ja seeläbi ka energiaülekannet reguleerib ning seda on ülevaatlilikult kirjeldatud järgmises peatükis.

### 2.3.2 Ergastuse relaksatsioonirajad on antennides reguleeritud valkude poolt

Footoni neeldumine fotoaktiivse pigmendi elektronis tõstab selle ergastatud olekusse, mis on erinevate võimalike relaksatsioonirade alguspunktiks (Joonis 4). Antennidevaheliselt ja -siseselt liigub ergastus kõrgemast energiast madalama energiaga ja seega pikemat lainepikkust neelavatesse saitidesse, nagu näiteks Karotenoid- $\sim 550\text{nm}$ ->LH2 $_{800\text{nm}}$ ->LH2 $_{850\text{nm}}$ ->LH1 $_{875\text{nm}}$ -RC. Karotenoididelt on ergastust võimelised vastu võtma nii B800 kui B850 bakteriklorofüllid ning võivad toimuda erinevate LH2 antennide B850-B850 ülekanded, enne LH1 jõudmist (Macpherson jt., 2001; Frischmann jt., 2013; Saer ja Blankenship, 2017).



**Joonis 4. (Mugandatud) Fotoergastuste migratsioon fotosünteesilise purpurbakteri valgust koguvates antennides ja nende vahel. Eeldatud on selektiivset ergastust B800 ribasse, millele järgneb ergastusenergia energeetiliselt „allamäge“ liikumine (relaksatsioon). Kõigepealt LH2 sees B800 süsteemilt B850-le, seejärel LH2 ja LH2 ning LH2 ja LH1 komplekside vahel. Ergastusenergia järjest aeglustuv kandumine keskele LH1-RC kompleksile peädib lõksustamisega RC-l (Frischmann jt., 2013; Saer ja Blankenship, 2017).**

Kõige kasulikum relaksatsioonirada on edukas footoni energia ülekanne valgust koguvalt antennilt reaktsioonitsentrisse (RC), kus see aitab elektroni laengu molekulilt lahutada. Selline rada aga pole alati võimalik, kuna RC võib juba olla lahutunud elektrilaenguga olekus ja ei ole võimeline lisanduvat ergastusenergiat konverteerima. Taolise energiaülejäägiga tuleb samuti tegeleda enne, kui see jõuab luua fotodegradeerivaid kõrvalprodukte. Valgust koguvad kompleksid on selle tõttu



varustatud mehhanismiga, mis suunab saabuva ergastusenergia kasulikesse positsioonidesse või siis hajutab ülejäägi viisil, mis ei kahjusta rakku. (Saer ja Blankenship, 2017)

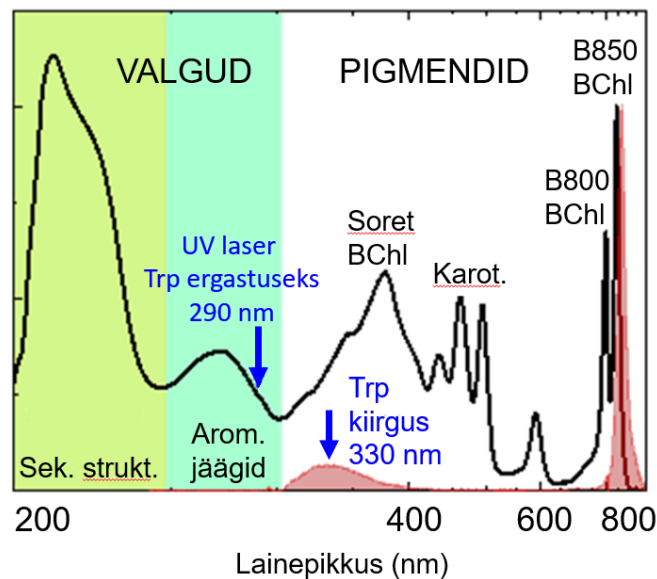
Ülejääva ergastuse kustutamisel võib olla roll karotenoididel, mis moodustavad triplet-triplet energiaülekande, korjates reaktsiivselt triplet BChl'ilt energia enne, kui see jõuab hapnikuga reageerides singlet hapnikke ( $^1\text{O}_2$ ) tekitada.  $^3\text{BChl}^*$  ja karotenoidi reaktsiooni tagajärjel tekkiv triplet karotenoid hajutab liigse ergastusenergia soojust või fluorestsentsina (Cogdell jt., 2000). Kui reaktsioonitsentris asuv karotenoid oksüdeerub teisi molekule päästes, siis vahetub see välja intaktse karotenoidiga, kuna teiste molekulide inaktivatsioonil võib kogu antenn inaktiveeruda (Skulachev jt., 2013). Samas praeguse seisuga ei saa enam öelda, et karotenoididel on vaid antioksidantne roll, kuna leidub erinevaid töid, mis toovad ka välja nende pro-oksüdatiivse efekti (Poliak jt., 2018; Boehm jt., 2020). Taolise suunatud relaksatsiooni ja kustutamise tõttu on pigmentidel rohkem erineva energiaga neeldumismaksimume ja vähem kiirgusmaksimume (Joonis 5, lk 18), sest osa neelduvast energiast on vahepeal koondunud madalamatesse saitidesse või hajumise tõttu kustunud ja ei ole enam spektrites eristatavad.

Antennide arvukus ning häälestus sobivale valguslainepikkusele oleneb elukeskkonna valgustingimustest. Madala valguse juures sünteesitakse bakteris iga LH1-RC kompleksi kohta suuremal arvul perifeerseid LH2 antenni ja osades bakteriliikides toimuvad valgustingimuse muutudes antennides väikesed modifikatsioonid. Näiteks purpurbakter *Rps. Palustris* puhul toimus madala valguse tingimustes energia reaktsioonitsentrist kaugemale liikumise (LH1->LH2) aeglustumine (Niedzwiedzki jt., 2018). Samas rohke valgusega keskkonnas on soodustatud mäest üles ülekande LH1->LH2 suunal, et vältida liigse ergastuse kahjustust (Deinum jt., 1991; Moulisova jt., 2009; Lüer jt., 2015). Purpurbakterite antennkomplekside spektroskoopiliselt erinevad vormid olenevad *pucBA* alleelide poolt kodeeritud  $\alpha/\beta$ -polüpeptiidi variantidest, kuid nende täpset mõju neeldumisspektrile on keerukas analüüsida seni kuni LH2 kõrglahutusega struktuuri mudel puudub (Gabrielsen jt., 2009; Niedzwiedzki jt., 2018). Siiski on selgunud, et LH2 neeldumisspekter on  $\alpha/\beta$ -polüpeptiidide primaarjärjestusest (Fowler jt., 1995) ning üksteise suhtes paiknemisest (Brotosudarmo jt., 2009) sõltuv. Valgumaatriks reguleerib pigmentide ergastuse liikumise suunda ja kiirust (Harel ja Engel, 2012), varieerides pigmentide omavahelist kaugust, positsiooni ja valk-pigment interaktsioone nagu H-sidemed, aminohappejääkide mõjutused laengule, pigmendi sideme planaarsuse painded (Adolphs ja Renger, 2006).

## 2.4 Optilised markerid

### 2.4.1 Antennid on valgustundlikud ultravioletist kuni lähi-infrapunaseni

LH2 antenni 200-1000 nm neeldumisspektri (Joonis 5, must joon) võib jaotada kaheks. Valkudes (nt Trp) neeldub kõrge energiaga ja lühemalaineline 200-300 nm ultravioletne (UV) valgus ning pigmentides (nt Bchl) neeldub suure varieeruvusega footoneid, mille lainepikkuseks võib olla 300 kuni 1000 nm. Pigmentide puhul keskendutakse antud töös ainult kõige infrapunasemale (IR) osale, mis jääb vahemikku 700-1000 nm.



Joonis 5. *Rba. sphaeroides* CrtC- mutandi LH2 antennkompleksi neeldumis- (must) ja fluorestsentskiirguse spektrid (punane). Neeldumisspekter on jaotatud laias laastus kaheks – valkude neeldumine ja pigmentide neeldumine. Bakteriklorofüll a erinevate neeldumisribade nimetamisel on kasutatud üldkasutuses olevaid tähistusi - B800, B850 ja Soret. Antud mutandi LH2 peamiseks karotenoidiks on neurosporeen, mille ribas on kolm teravat neeldumismaksimumi 400-550 nm vahel. Trüptofaani kiirguse tekitamiseks kasutati ~290 nm lainepikkusega valgust (sinine nool). Graafikul on osutatud ka trüptofaani kiirguse maksimumile  $\lambda_{\text{max}} \sim 330$  nm, mille rõhunihke uurimine on antud töö üheks fookuseks. (@TÜFI biofüüsika labor)

Spektri alguses, valkude neeldumises, kerkivad kaks laia riba, 220 nm juures neelavad põhiliselt peptiidsidemed ja sekundaarstruktuurid ning 280 nm maksimumiga neeldumisribasse panustavad üheaegselt kõigi valkude kõik aromaatsed aminohappejäägid - trüptofaan (Trp, W), türosiin (Tyr, Y), fenüülalaniin (Phe, F) (Lakowicz, 2006). Purpurbakterite valgust koguvates antennides moodustub valgumaatriks kahest 6 kDa transmembraansest valgust,  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidist, mille

vahele on mittekovalentselt seotud kofaktoritena 3 bakteriklorofüllid ning karotenoidid (Brunisholz ja Zuber, 1992; Loach ja Parkes-Loach, 1995; Koepke jt., 1996; McDermott jt., 1995; Suzuki jt., 2007; Niedzwiedzki jt., 2018). Kõik valgud neelavad UV valgust, kuid kiirgavad reeglina vaid need, milles on konjugeeritud  $\pi$ -sidemed aromaatses tuumas või ahelana (erandiks on GFP-sarnased valgud) (Sugioka, 2009). Trp on viit konjugeeritud  $\pi$ -sidet sisaldava heterotsükliilise aromaatses rühmaga aminohappejääk (Atkins ja de Paula, 2006), mille kiirgus reageerib keskkonna muutustele väga tundlikult (Lakowicz, 2006).

Spektril edasi liikudes peab siiski märkima, et kaugelt kõige kõrgemalt hinnatud reporter-kromofoorid on pigmendimolekulid (sh BChl B800 ja B850 ribad), mis küll ei ole nii lokaalsed nagu Trp, kuid on samuti väga tundlikud ning oluliselt vähem kapriissed. Esiteks, tänu pigmentide suuremale konjugeeritud  $\pi$ -elektronide süsteemile on nad kergesti polariseeritavad, reageerides ka kõige väiksematele muutustele pigmente ümbritsevas keskkonnas. Teiseks, energiaülekande ahela lõpus asuvate (st madalaimat ergastusenergiat omavate) klorofüllide fluorestsentsi kvantsaagis on valkudes üsna kõrge. Kolmandaks, kuid mitte viimases järjekorras, pigmentide pikalainelised valguse neeldumiskirgusribad on sageli spektri piirkonnas, mis on spektroskoopilisteks uuringuteks mugav, mis leidis korduvalt kinnitust ka käesoleva töö eksperimentide jooksul (Frauenfelder, 1984; Friedrich, 1995; Jankowiak jt., 1993; Lesch jt., 2004). Sealjuures infrapunased neeldumise lainepikkuse järgi nime saanud  $Q_y$  ribad B800 ja B850 on vaid osa BChl a neeldumisest, samast pigmendist tekivad 300-1000 nm vahemikus veel ka ajaloolise nimetusega Soret riba ( $\sim 370$  nm,  $B_x/B_y$ ) ning  $Q_x$  ( $\sim 600$  nm) (Grimm jt., 2006).

Lühida kõrvalepõikena peab välja tooma, et lisaks niigi laiale BChl neeldumisvahemikule täiendavad antennide valguse kogumise laiahaardelisust karotenoidid, püüdes keskkonnast footoneid vahemikus 400-600 nm (Hunter jt., 2008; Croce jt., 2018), et keskkonnast kogutud kvantenergia seejärel naabruses paiknevatele bakteriklorofüllidele üle anda (Frank ja Cogdell, 1996). Karotenoidid iseenesest on koondnimetus grupile erinevatele pigmentidele, mis varieeruvad nii antennitüüpides kui bakteriliikides, ning neil on ka erinevad spektrid - *Rba. sphaeroides* CrtC<sup>-</sup> mutandile omase karotenoidi neurosporeeni  $S_2$  elektronüleminekule vastab kolme terava maksimumiga riba. Käesolevas töös karotenoidide spektreid ei uurita, aga tasub teada, et neil on antennide ehituses oluline stabiliseeriv roll (Hunter jt., 2008) ning põhjus miks eksperimentideks valiti muteeritud karotenoidide rajaga ja seega metsiktüübist mõningal määral ebastabiilsem *Rba. sphaeroides* antenn, peitub selles, et töö eesmärgiks on jälgida vesiniksidemete katkemist, mis destabiliseeritud antennis on kergem lõhkuda.

Spektri kiirguse osa vaadates (Joonis 5, lk 18, punane joon) võib märgata, et valkude kiirguses leidub kuni 350 nm footoneid ning pigmentide kiirguses eristub LH2 puhul kahe neeldumismaksimumi (B800, B850) kohta vaid üks kiirgusmaksimum (~850 nm). Karotenoidide ja B800 kiirgusmaksimumide tugeva kustumise põhjuseks on antennide efektiivset energiaülekande voogu tekitav ehitus, mille tõttu B800 ja karotenoidides neeldunud ergastus relakseerub kiiresti ja kantakse üle B850 oligomeeri bakterklorofüllidele, millest tulenevalt bakterklorofüllide ainus maksimum kiirgusspektris on B850 (~866 nm) (Gellings jt., 2020).

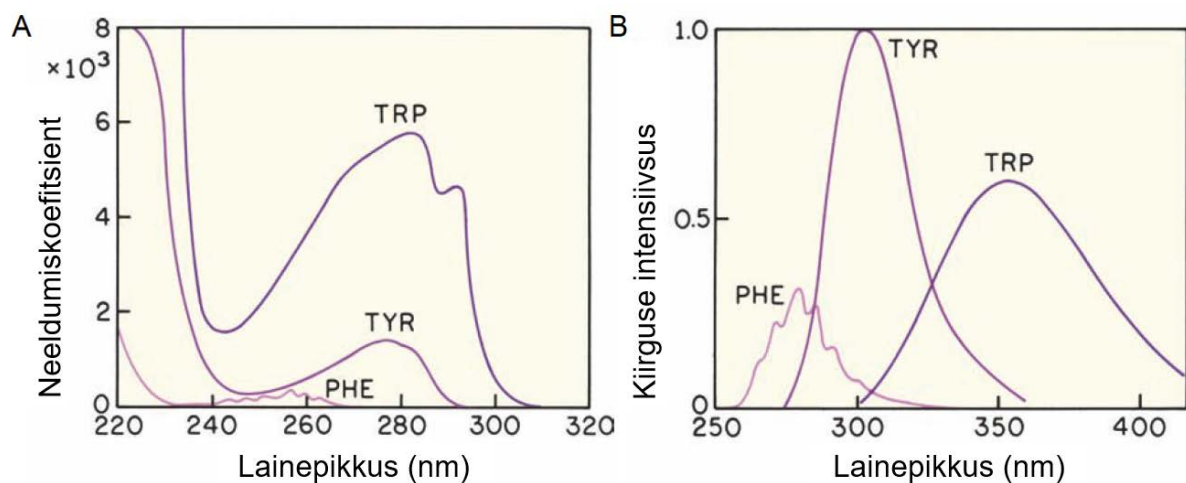
Käesolevas töös kasutati pigmentide puhul kahest spektritüübist vaid neeldumisspektreid, kuna neeldumisspekter pole ühtesulanud ja valkude puhul kasutati vastupidiselt kiirgusspektreid, kuna nende puhul lahutub paremini komponentideks just kiirgusspekter. Kõiki asjaolusid kaaludes valisime käesolevas töös optilisteks markeriteks pigmentide osas B850 lähi-infrapuna (IR) neeldumise ja valgu osas Trp UV fluorestsentsi.

## 2.4.2 Trüptofaan optilise markerina

Selleks, et antennide hüdrofoobsetesse taskutesse hüdraatvee tungimist seostada BChl-valk H-sidemete katkemisega või seost välistada, oli esiteks vajalik leida polaarsuse osas tundlik marker. Samuti oli vajalik, et see oleks oleks lokaalne ning interaktsioonis uuritava B850 oligomeeriga, mille spektreid seni H-sideme katkemise kontekstis uuritud on. Kõigile neile tingimustele vastab Trp fluorestsents. Väljakutset valmistab aga, et tegemist on pigmentidega võrreldes palju kapriisema markeriga, mille jaoks on vajalik erinev seade ehitada ja uus meetodika leida. Samas Trp teatud keerukustega kaasneb ka suur tundlikkus ning lokaliseerimise täpsus (Eftink, 1994; Vivian ja Callis, 2001; Lakowicz, 2006), mille tõttu on see pigmentide infrapuna analüüsi kõrval olulist informatsiooni lisandav marker. Trp kiirguse maksimum võib ümbruskonna mõjul nihkuda vahemikus 308-350 nm (Lakowicz, 2006). Klassikaliselt tõlgendatakse  $\lambda_{\max}=330$  Trp keskkonda mittepolaarsena (sininihkes, ebastabiilsem, hüdrofoobsemas keskk.) ning  $\lambda_{\max}=350$  nm polaarsena (punanihkes, stabiilsem, hüdrofiilsemas keskk.). Nt, võib tõlgendada, et natiivse valgu  $\lambda_{\max}=330$  nm, ning selle +20 nm punanihe (350 nm'ni) näitab, et valk on lahti voltunud ja on suuremas kokkupuutes polarse lahustiga (Eftink, 1994; Ghisaidoobe ja Chung, 2014). Erinevate valkude Trp võib olla samas lahustis 5-10 nm sini-punanihkes, kui valgu elektrostaatika mõjutab hüdraatvee struktuuri viisil, mis omakorda orienteerib Trp dipool momenti (Vivian ja Callis, 2001). See näitab, et kuigi Trp fluorestsents on ka rõhu-uuringutes kasutuses olnud 50 a (Roche ja Royer, 2018), siis

oluline on iga valgu ja kasutatavate kemikaalide osas tuvastada empiirilised spektraalsed mustrid ja asetada need erinevatest uuringutest saadud info konteksti.

Kolme fluorofoorse aminohappejäägi (Phe, Tyr, Trp) neeldumine on suures osas kattuv (Joonis 6.A), kuid kuna Trp neelab ainsana ka üle 290 nm valgust, siis on võimalik spektraalselt kitsa laserikiirega neeldumisspektri pikemalainelist serva tabades ergastada vaid Trp kiirgust. Neeldumise (Joonis 6.A) ühtevalgumise tõttu kasutatakse Trp põhjalikuks analüüsiks hoopis kiirgusspektreid (Joonis 6.B), mille lahusus on suurem (Lakowicz, 2006). Tehniliselt on spektraalse lahususe tõstmiseks võimalik kasutada kunstlikke Trp analooge nagu 7AW (neeld. 310 nm; kiirg. 380 nm) (Karadi jt., 2020), hüdratsioonitundlikkuse tõstmiseks Trp<sub>CN</sub> (Markiewicz jt., 2016) ning lokaalsuse tõstmiseks saab vähendada looduslike Trp arvu (Maksimov jt., 2020). Seevastu metsiktüüpi Trp eeliseks on mitteinvasiivsus (Ghisaidoobe ja Chung, 2014).



**Joonis 6. (Mugandatud) Valguomaste reporter-fluorofooride fenüülalaniin (Phe), türosiin (Try) ja trüptofaani (Trp) neeldumis- (A) ja kiirgusspektrid (B) (pH=7) (Lakowicz, 2006). Näeme, et neeldumisribad kattuvad suures osas, samas kui kiirgusribad on spektraalselt rohkem eraldunud.**

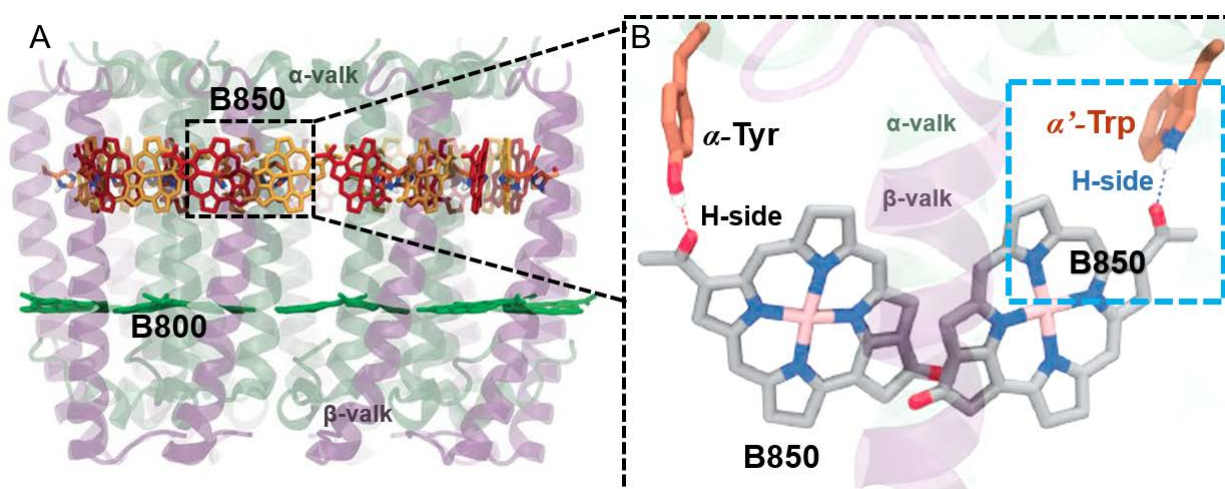
Isegi, kui üks kiirgusriba koosneb mitmest Trp jäägist üle kompleksi on see füüsikaliselt olemuselt siiski lokaalne marker ning peegeldab ainult mikrokeskkonnas toimuvat (Lakowicz, 2006; Renge ja Mairing, 2013; Roche ja Royer, 2018), mis on põhimõtteline erinevus võrreldes pigmendi B850 oligomeerist ( $N_{BChl}=16-18$ ) (Pajusalu jt., 2019), mis jagab ergastust kollektiivselt (eksitonina) ja seetõttu pole võimalik spektririba (energiat) ühe kindla molekuliga seostada. Trp kiirguse

intensiivsus on samuti mikrokeskkonna osas tundlik, seetõttu ei seostata signaali tugevust tavaliselt jääkide arvuga, vaid eelkõige Trp kustutajate lähedusega ning sellega, kas Trp asub valgu sees või väliskihis (Lakowics, 2006). Trp kustutajateks on ümbritsevad ühendid, mis võtavad ergastusenergia endale kas FRET kaudu või siis aktsepteerivad kogu ergastunud elektroni (nt glutamiin Q, asparagiin G, glutamiinhape E, asparagiinhape D, tsüsteiin C, histidiin H) või prootoni (lüsiin K, türosiin Y), mistõttu pole Trp'il enam footoni kiirgumiseks energiat ja spektri kiirguse intensiivsus langeb (Ghisaidoobe ja Chung, 2014). Sellisel juhul põhjustab kustumist Trp ergastatud indoolrühma omadus elektrone loovutada, mille tulemusel pärast ergastamist elektron ei relakseeru fluorestsentskiirguse kaudu vaid lahku Trp orbitaalilt (Lakowicz, 2006; Peng ja Callender, 2018). *Rba. sphaeroides* nonameerse LH2 Trp arv on teadaolevalt ~36-40 ning need paiknevad suuremas osas pindmises osas (Joonis 10, lk 28) ning *Tch. tepidum* oktameeris ~40-48. Seega igas subühikus leidub 4-6 Trp jääki ning lisaks veel 5-9 fluorestseeruvat Tyr või Phe jääki (Tabel 3, lk 85). Kolm fluorofoori on märgitud LH2  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidide järjestustes (Tabel 2.A, lk 84), kõrvuti Trp kustutajatega (Tabel 2.B, lk 84).

Trp puhul võib lisaprobleeme tekitada ka see, et see neelab vaid UV kiirgust ning seetõttu võib tugev laserergastus põhjustada valgu fotodegradatsiooni. Huvitav tehnika selle vältimiseks on nt UV footoni (300 nm;  $\sim 33\,333\text{ cm}^{-1}$ ) energiat vajavasse osakesse viia kaks madalama energiaga footonit (600 nm;  $\sim 16\,667\text{ cm}^{-1}$ ), mis tandemina kannavad neeldumissaiti kokku sama palju kvantenergiat nagu üks UV footon (Ghisaidoobe ja Chung, 2014). Sagedamini kasutatakse siiski klassikalist 275 - 295 nm Trp ergastust (Lakowicz, 2006), mis on küll kõrge energiaga ja kahjulik, aga on kasutatav vastupidavamate valkude nagu ka antennide jaoks – kui leida sobiv meetod.

### 2.4.3 Vesiniksidemete katkemise mõju bakteriklorofüllil ja trüptofaani spektritele

Ligandi B850 ja valgu Trp vahel moodustuvate H-sidemete (Joonis 7) rõhu mõjul katkemisel toimub B850 neeldumises sininihe ( $+\Delta\nu$ ;  $-\Delta\lambda$ ) (Kangur jt., 2008a). B850 sininihe toimub, sest oligomeeri moodustava iga üksiku BChl üleminekuenergia suureneb, mis on tingitud konjugeeritud porfüriiniahela lühenemisest H-sideme katkemise tulemusel (H-sidemest vabanenud atsetüülrühm pöörduv molekuli tasapinna suhtes rohkem ristiasendisse) (Freiberg jt., 2010). Teisisõnu, deformatsiooni tõttu muutub ergastusolekusse üleminek energiakulukamaks ning pigment neelab suuremat energiahulka sisaldava valguskvandi, et ergastuda.

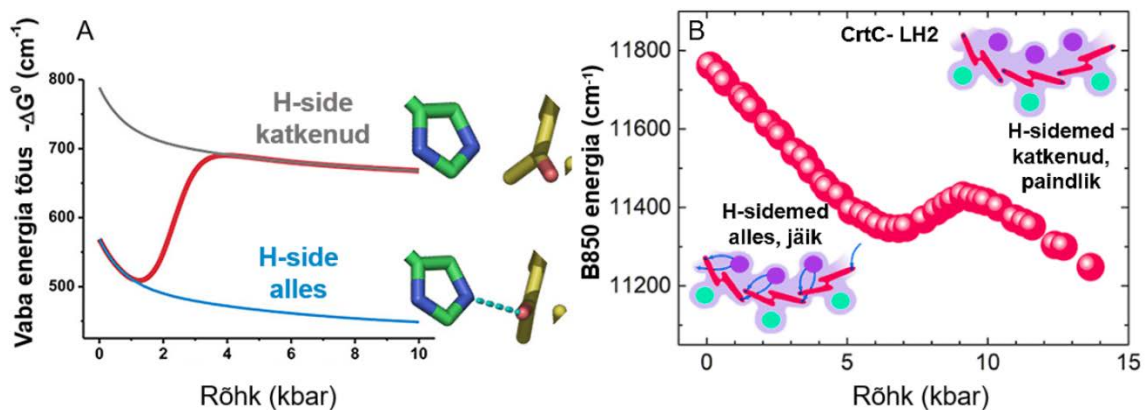


**Joonis 7. (Mugandatud) (A) *Rps. acidophila* LH2 antennkompleksis asuvad B800 ja B850 oligomeeride bakteriklorofüllid. (B) Valk-pigment H-sidemed ühe antenni subühiku  $\alpha$ -polüpeptiidi Trp jäägi ning teise subühiku Tyr ja B850 BChl a atsetüülrühma vahel. *Rps. acidophila*  $\alpha$ -Tyr44-B850 ja  $\alpha$ -Trp45-B850 H-sidemed (Cardoso Ramos jt., 2019).**

Valk-pigment H-sidemete võrgustiku erisuste mõju BChl pigmendi markerite B800, B820, B850 neeldumisspektritele on suhteliselt kaua ja palju uuritud (Fowler jt., 1994; Sturgis jt., 1997; Kangur jt., 2008a; Golub jt., 2019) ja on korduvalt kinnitatud, et H-sidemete katkemise või vähenemisega kaasneb BChl  $\lambda_{\max}$  sininihe ( $+\Delta\nu$ ;  $-\Delta\lambda$ ) ning lisandumise või rõhu toimel tugevnemisega BChl  $\lambda_{\max}$  punanihe ( $-\Delta\nu$ ;  $+\Delta\lambda$ ) (Luong jt., 2015; Fanetti jt., 2018). Sealjuures rõhu eksperimentides on tavaline H-sidemete tugevnemine ning punanihe, ning katkemine ja sininihe erandlikud (Kangur jt., 2008a; Luong jt., 2015). Eelnevate järeltulemuste tegemiseks on uuritud erinevate H-sideme arvudega *Rba. sphaeroides* mutantide spektrite erinevusi (Fowler jt., 1994), Trp-BChl H-sidemete

sarnasust LH1 ja LH2 antennis (Sturgis jt., 1997), LH2 B820 variandi valk-BChl H-sidemete vähenemist võrreldes rohke valguse B850 variandiga (Sturgis jt., 1995), H-sidemete katkemist peegeldavat CrtC- mutandi LH2 B850 sininihet (Kangur jt., 2008a), LH2 H-sidemete katkemise korrelatsiooni valgu paindlikkuse suurenemisega (Golub jt., 2019) ning *Rba. sphaeroides* sarnase *Rps. acidophila* kõrges ja madalas valguses ekspresseeruvate antennide H-sidemete erinevusi (Cardoso Ramos jt., 2019). Valgustingimuste kohastumused on üks näide, mis tõestab H-sidemete tähtsust antennide toimimises. LH2 tugeva valguse variandiga (B800-B850) võrreldes on selle madala valguse (B800-B820) variant sininihkes ( $\Delta\lambda = -30$  nm;  $\Delta\nu = +430$  cm<sup>-1</sup>), sealjuures on leitud, et B820 antennis on vähem valk-BChl vesiniksidemeid (Fowler jt., 1994; Sturgis jt., 1995). *Rba. sphaeroides* sarnaseks peetava *Rps. acidophila* B850 oligomeeri H-sidemete vähenemise mõjuks oli BChl-BChl uus paigutus, kus neil oli väiksem vastasmõju ehk nõrgem eksiton (Cardoso Ramos jt., 2019).

Käesolevas töös uuritavate purpurbakterite antennide osas on teada, et  $\alpha/\beta$ -polüpeptiidi Tyr, Trp ja B850 BChl vahel toimub H-sidemete moodustumine (Fowler jt., 1994; Sturgis jt., 1997) ja ka see, et *Rba. sphaeroides* CrtC- LH2 (mille analoog on *Rps. acidophila*) puhul on neid H-sidemeid võimalik hüdrostaatilise rõhu abil lõhkuda ning see põhjustab B850 neeldumise spektris sininihke (Kangur jt., 2008a). Samuti on RC näitel leitud Gibbsi vaba energia ( $-\Delta G$ ) tõusu valk-BChl H-sideme katkemise puhul (Joonis 8.A) (Jalviste jt., 2020) ning antenni paindlikkuse tõusu LH2 valk-B850 puhul (Joonis 8.B) (Golub jt., 2019).



**Joonis 8. (Mugandatud) Valk-BChl H-sidemete katkemise mõju. (A) RC BChl-valk H-sideme katkemisel toimuv vaba energia tõus (Jalviste jt., 2020). (B) B850-valk H-sideme katkemise mõju CrtC- LH2 valgu paindlikkusele (Golub jt., 2019).**



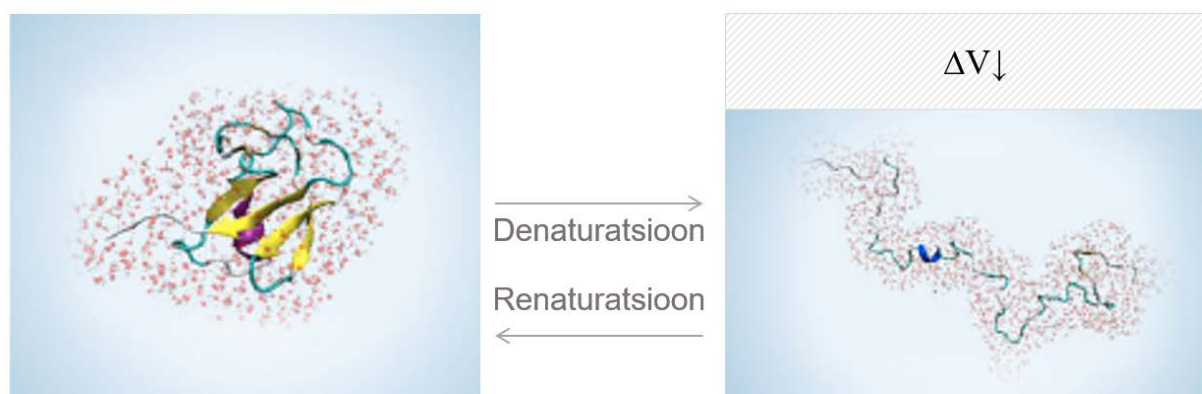
Seevastu töös kasutatud võrdlustüve, *Tch. tepidum*, B850 spektrites esineb ainult punanihe ja H-sidemete katkemist ei ole tuvastatud ka kõrgetel rõhkudel (Kangur jt., 2020).

Trüptofaani spektrite osas taolist selgust veel pole, purprubakterite LH2 antennide Trp rõhusõltuvust ei ole veel uuritud. Valkude Trp sininihe võib toimuda B850 sininihkega paralleelselt, aga selle tähendus on erinev. Trp reageerib polaarsuse muutustele, mitte kvantsidususe tugevusele nagu B850 ja seega Trp ei sõltu kogu antenni terviklikust korrapärast, vaid sellest, kuidas tema indoolrühm erinevate mikrokeskkonna interaktsioonide mõjul polariseerunud on (Vivian ja Callis, 2001; Lakowicz, 2006; Ghisaidoobe ja Chung, 2014). Teada on, et H-sidemed on üks interaktsioonidest, mis Trp kiirgust mõjutavad (Hager ja Wallace, 1984; Koenig jt., 2001; Ghisaidoobe ja Chung, 2014). Näiteks on tõestatud, et Trp derivaatide indoolrühma NH antud ja lahusti aktsepteeritud H-sidemete tekkimine nihutab Trp kiirgust punasemaks, aga sidet mitte moodustavas lahustis on Trp analoogid sininihkes (Koenig jt., 2001). Vastanduva näitena saab tuua tsüanobakterite karotenoid-Trp H-sideme fotoindutseeritud katkemisel tekkiva Trp 3 nm punanihke (millega kaasnes ka neljakordne intensiivsuse kasv) (Maksimov jt., 2020). Huvitavat spektraalset leidu on raporteeritud ka maomürgist pärit ensüümi BPLA<sub>2</sub> uurides, mille Trp fluorestsentsis leiti 4 kbar rõhul toimuv üleminek tavapäraselt punanihkelt +500 cm<sup>-1</sup> sininihkele (katse lõpp 6,5 kbar). Töö autorid tõid välja, et 1998. a eelnenud ajal polnud taolist nihet keegi varem kirjeldanud ning leitud Trp fluorestsentsi sininihkele pakuti pärast agregatsiooni välistamist klassikalist tõlgendust, et tekkis konformatsioon, kus Trp maeti sügavamale mittepolaarsesse keskkonda (Ruan jt., 1998). H-sidemete võimalikku mõju eeltoodud uurimuses ei tõstatatud, kuid ei saa tähelepanuta jätta, et see on üks vähestest eksperimentidest, kus Trp mustri kirjeldus kattub käesolevas töös kirjeldatuga. Sama rühma järgmiste valkude rõhuhäirituse eksperimentides toimus rõhu tõusul Trp fluorestsentsi klassikaline punanihe (Ruan jt., 2000).

Millised rõhu toimetel tekkinud konformatsioonilised muutused käesolevas töös vaadeldud LH2 antennides H-sidemete katkemist põhjustavad ei ole veel teada ja seetõttu ongi huvitav leid, et *Rba. sphaeroides* CrtC- LH2 on üks vähestest valkudest, milles on rõhu toimetel H-sidemete katkemist täheldatud, sest seda on võimalik kasutada H-sidemete katkemise mehhanismide välja selgitamise mudelina.

## 2.5 Rõhu kaudu vesiniksidemetes häirete esile kutsumine

Rõhu-häirituse toime saab valkude konformatsiooni tõugata energeetiliselt ülesmäge denaturatsiooni ja sealhulgas ka H-sidemete katkemise suunas, kuid hiljem ka lasta valgul tagasi kukkuda natiivsesse energeetiliselt soodsasse olekusse, mille kuju vormimisel olulised tertsiaarsed interaktsioonid ja sidemed taastuvad. Denaturatsiooni saab esile kutsuda ka termilise ning keemilise häiritusega (uurea, guanidiinvesinikkloriid), kuid rõhu kasutamisel on mõned eelised (Roche ja Royer, 2018). Nimelt levib rõhk ülekandvas meediumis momentselt, seega termodünaamilise muutuja mittehomogeensus ei ole probleemiks; rõhku saab tõsta ja ka langetada kiirelt (Meersman ja McMillan, 2014; Luong jt., 2015). Alates 1914. a esimese rõhuhäirituse eksperimendi publitseerimisest 1946. a Nobeli laureaadi Percy Bridgman'i poolt (Bridgman, 1914), kasutatakse meetodikat jätkuvalt nii valkude voltumise ja termodünaamika, hüdrofoobsete taskute ruumala ja hüdraatumise (Joonis 9), multimeeride dissotsiatsiooni ning viimasel ajal ka ligandi seostumisest põhjustatud valguga ruumala muutuste uurimiseks (Cioni ja Gabellieri, 2010; Luong jt., 2015; Skvarnavičius jt., 2017; Roche ja Royer, 2018).



**Joonis 9. (Mugandatud) Valkude denaturatsioon välise rõhu toime. Kui natiivses olekus on valgustruktuuris hüdrofoobsed taskud, siis rõhu survele võib polaarne lahusti ( $\text{H}_2\text{O}$ , punased täpid) taskud täita, millega kaasneb ruumala vähenemine ( $\Delta V \downarrow$ ). Rõhu toime toimuv valguga denaturatsiooni on tihti pööratav (Roche ja Royer, 2018).**

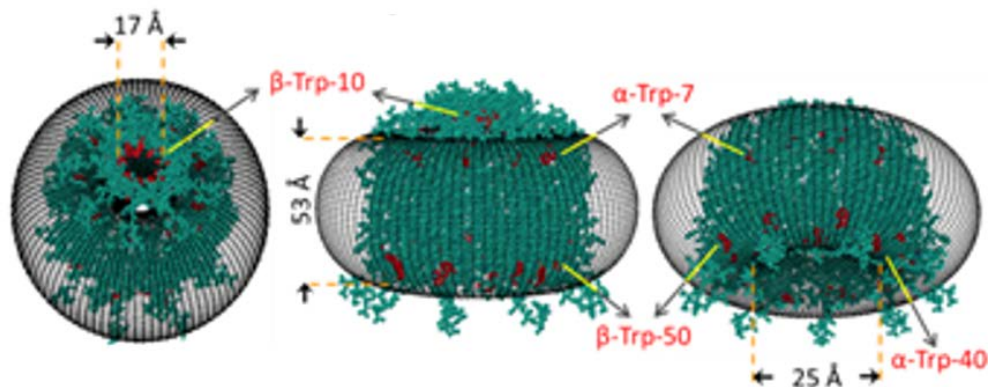
Kõrge rõhu tekitamiseks kasutatakse antud töös teemantalasi-rõhurakku (Joonis 11, lk 36), mis on selle leiutamisest alates (Jamieson jt., 1959) laialt kasutuses olnud ning jätkuvalt täiendatav (Dewaele jt., 2018) molekulide rõhu-häirituse esilekutsumise seade (Roche ja Royer, 2018).

Kõige sagedamini kasutatakse rõhu-häirituses rõhusensorina rubiini ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{:Cr}$ ) (Syassen, 2008), kuid see on vaid üks variantidest. Rõhurakku sisestatud lahusesse saab rõhu mõõtmiseks lisada kristalle, mille kiirguse lainepikkuse seos rõhuga on lineaarne ja mis on ise rõhu-stabiilsed. Rubiini kiirgust saab mõõta vaid laseriga ergastades, seega proovide puhul, mis laserikiirgust ei talu või ei vaja (infrapuna, röntgen, Raman) soovitatakse kasutada kvartsi (Chervin jt., 2005). Väga kõrgetel rõhkudel ning temperatuuridel soovitatakse rubiini asemel kasutada NaCl; ülikõrgetel rõhkudel kulda, hõbedat, plaatina (Chervin jt., 2005). Väiksematel rõhkudel võib jällegi sobivam olla TMMC, kuna on rubiinist tundlikum ja sobivam väiksemate rõhusammude jälgimiseks (Nataf jt., 2009). Kõikidest variantidest valiti käesolevas töös rõhusensoriks rubiin, sest kasutati võrdlemisi suuri, kuid mitte ülisuuri rõhkusid ning ka rõhu tõstmise samm ei olnud väike (0,5 kbar), samuti polnud laserergastuse kasutamiseks takistusi. Kuna rubiini kui rõhusensori spektri määratav nihe on üsna väike ja temperatuuri suhtes tundlik, siis oli vajalik kiirgus kalibreerida igas katsepunktis reeperlambi abil. Näiteks sobivad lainepikkuse referentsiks tugeva ja kitsa spektrijoonega vääriskaasid krüptoon (Kr), ksenoon (Xe), argoon (Ar) jm. (Goehlich jt., 1998). Käesolevas töös kasutati Ne/Ar reeperlambi vääriskaas neooni (Ne) spektrijoont ( $\sim 692,9$  nm), mis on väga kitsas ja suhteliselt kõrge, temperatuurist ja rõhust sõltumatu ning asub kalibreeritavate rubiini  $R_1$  ja  $R_2$  kiirgusribade ligiduses ( $R_1 \sim 694,25$  nm;  $R_2 \sim 692,8$  nm) (Grasset jt., 2001).

Rõhud, mida on teemantist alasite kokkusurumisel suudetud saavutada, on väga suured, nt 1065 GPa ( $\sim 11000$  kbar) (Dubrovinskaia jt. 2016), mis on kolm korda kõrgem Maa südamikus olevast rõhust 363 GPa ( $\sim 3630$  kbar) (Anzellini jt., 2013). Seadme eri variantidega on võimalik imiteerida enamikke Maa rõhkusid (0,001-3630 kbar) ning juba ka suuremate planeetide siserõhkusid (3630-11000 kbar). Bioloogiliselt pakuvad huvi rõhud kuni 20 kbar, biolaborites on tavaline seadmete piir 2-6 kbar, mistõttu on ka välja toodud, et arenguruumi jagub (Roche ja Royer, 2018). Tavaliselt toimub valkude oligomeeride lagunemine 1-2 kbar ja denaturatsioon 3-4 kbar surve (Cioni ja Gabellieri, 2010). Maa arvatavasti kõige raskema hüdrostaatilise surve all eksisteeriv Mariaani süvikus asuv piesofiilne elustik talub ning vajab eluks 1,1 kbar, sealjuures ei ole kõrgrõhu keskkond üldse haruldane, ookeanist moodustavad kõrgrõhu elukeskkonnad 88%, kus on keskmiselt 0,380 kbar (Daniel jt., 2006). Võrdluseks, Maapinna normaalrõhuks peetakse 0,001 kbar (1 atm) ning kõrgeimates punktides võib õhurõhk olla arvutuslikult  $\sim 0,0003$  kbar ( $\sim 0,3$  atm).

## 2.6 Detergendimitsell stabiliseerib membraanvalke vesilahuses

Lisaks looduslikke membraane moodustavatele fosfolipiididele käituvad teised pindaktiivsed ained nagu detergendid teatud tingimustel sarnaselt, moodustades hüdrofoobse efekti tõttu membraane, vesiikuleid ning mitselle (Joonis 10) (Encyclopædia Britannica Inc., 2020). Piisaval detergendi kontsentratsioonil (CMC, *critical micelle concentration*) võib detergent adsorbeeruda vedelikus olevate tahkes faasis ainete ümber sellisel moel, et aine ümber moodustub mitsell - detergendi hüdrofoobne pea adsorbeerub tahkele ainele ning hüdrofiilne saba jääb veega kokkupuutesse (Soleimani Zohr Shiri jt., 2019). Seeläbi aitavad pindaktiivsed ained ületada hüdrofoobsete osakeste vesikeskkonnas lahustumatuse probleemi ning on võimelised komplekse stabiliseerima nii bioloogiliselt (nt fosfolipiidid) kui ka kunstlikult (nt detergendid) (Kronberg jt., 2014). Detergente kasutatakse membraanvalkude uurimisel agregatsiooni vältimiseks ja stabiliseerimiseks sageli (Garavito ja Ferguson-Miller, 2001), sealhulgas ka käesolevas rõhu-uuringus.



**Joonis 10.** Normaalrõhul lahuses oleva *Rba. sphaeroides* LH2 kromoproteiini (*puc2*) (roheline) ümber moodustunud detergendimitselli (hall toroid) topoloogiline kujutis. Membraanis on punaselt kujutatud Trp kokkupuutes vee molekulidega (©TÜFI biofüüsika labor).

## 2.7 Antennide uurimise rakenduslik huvi

Praegusel ajal on järjest rohkem arenguid bioloogiliste pigmentide baasil kolmanda generatsiooni Päiksepaneelide kommertsiaalsesse kasutusse võtmise suunas (Maddah jt., 2020), tõusva huvi põhjuseks on, et need seadmed on keskkondlikult ja majanduslikult odavamad ning töötavad siseruumides madalas valguses paremini, kui varasemad haruldastel komponentidel baseeruvad süsteemid (Carella jt., 2018). Valgust koguvaid biomolekule kasutatakse 1991. a Michael Graetzel poolt leiutatud kolmanda generatsiooni bioloogiliste pigmentide baasil Päiksepaneelides (DSSC, *dye sensitized solar cells*). See on veel arengufaasis, kuid kasvava tarbega tehnoloogia (Órdenes-Aenishanslins jt., 2016; Carella jt., 2018; Ravi jt., 2019; Maddah jt., 2020). Bakteriaalsete biomolekulide Päiksepaneelides kasutamise seisust on teinud ülevaate Maddah ja kolleegid (Maddah jt., 2020).

Siiski pole taimedelt, vetikatelt ja bakteritelt laenatud valgust koguvate antennide puhul veel päris selge, kuidas neid hübriidsetes seadmetes või Päiksekütuse bioreaktorites stabiliseerida (Ravi jt., 2019). See on üks paljudest põhjustest miks mitmed biofüüsika laborid üle maailma on pilgud pööranud ürgsete juurtega fotosünteesivate purpurbakterite poole, kelle valduses on ühed positiivselt robustseimad ja termostabiilsemad valgust koguvad kromoproteiinid (Maddah jt., 2020). Bakterid suudavad Päikselts kiirguvaid footoneid koguda ja keemiliseks energiaks muundada nagu kõrgemad fototroofidki, kuid on uurimisobjektina palju lihtsamad. Huvitav on ka, et nad suudavad valgust püüda ka kõrge stressi all väga omapärastes keskkondades, nagu kuumaveeallikates (Imhoff, 2017) või soolajärvedes (Imhoff, 2006), külmas ja ka praktiliselt pimedas (Overmann jt., 1992).

Fototroofseid kultuure kasutatakse ka biokütuse (vesiniku) tootmises (Jinkerson jt., 2011) ja keskkonna bioremediatsioonis (Luo jt., 2017). Kõik kolm eelmainitud funktsiooni on ühendatud ka fotobioelektrokeemiliseks reaktoriks, mis toimib reovee põhjal, toodab elektrit ning biokütust (Luo jt., 2017). Mittefototroofsete Antarktiliste bakterite valgust koguvaid karotenoide on uuritud DSSC kandidaadina kõrge UV-taluvuse aspektist (Órdenes-Aenishanslins jt., 2016). Hiljuti leiti, et purpurbakter *Rba. sphaeroides* fotopigmentidel on ka laengu säilitamise võime (Ravi jt., 2019). Looduslikud fotosüsteemid pakuvad suurt variatsiooni erinevaid valguse kogumise mehhanisme – õnnestunud on ka eri bakterite antennide ühendamine kimäärseks antenniks, mis vajab ergastamiseks tavapärasemast madalama energiaga valgust. *Tch. tepidum* infrapunaseimate footonite püüdmist põhjustav sait viidi *Rba. sphaeroides* tüvesse, mistõttu viimase

neeldumismaksimum punanihkus (Swainsbury jt., 2017a). Läbi on viidud ka eksperiment, kus Pääksekütuse tootmise eesmärgil lisati mitte-fototroofsetesse bakteritesse valgust koguvad osakesed (AuNCs), mis näitab, et potentsiaalselt on võimalik valgusenergiaga varustada mittefotosünteesivate organismide metabolismiradu, mis on tootmises palju sagedamini kasutuses (Zhang jt., 2018). Bakterite lihtsate süsteemide abil teada saadud fundamentaalseid põhitõdesid on loodetavasti võimalik ka rakendada taimede fotosünteesi uuringutes, ning aidata lahendada kliima soojenemise ja rahvastiku arvu tõusuga seotud vajadusi, et jätkata piisava koguse biomassi tootmist toiduks, kiududeks, kütuseks (Zivcak jt., 2017; Yamori jt., 2013). Pigment-valk interaktsioonide teadmised on oodatud ka meditsiinis, üks laiatarbeliseim näide on fotosünteesilised pigmendid nagu  $\beta$ -karoteen, mis on laiatarbe kasutuses antioksüdandina, kuid sel on leitud ka relaksatsiooniradu, mis on pro-oksüdatiivsed ning tõestatud on ka selle lisandi seos suitsetajate tõusnud vähiriskiga (Boehm jt., 2020).

### 3 Töö eesmärk ja hüpoteesid

Töö peaeesmärk oli katseliselt realiseerida mitteinvasiivne, valguomastel optilistel markeritel BChl B850 ja Trp põhinev meetodika, uurimaks fotosünteesiliste purpurbakterite LH2 antennikompleksides esinevat tertsiaarsete H-sidemete katkemise mehhanismi välise kõrge hüdrostaatilise rõhu toimet.

Purpurbakterite LH2 ja LH1 kompleksides tuvastati tertsiaarsete H-sidemete katkemine rõhu-häirituse eksperimentides, kui analüüsiti ebaregulaarseid nihkeid LH2 B850 ja LH1 B875 eksitonide IR-neeldumisspektrites (Kangur jt., 2008a; Kangur jt., 2012). Järgnevas sihiks seati H-sidemete katkemise füüsikalise mehhanismi väljaselgitamine. Antud töö on esimesi samme selles suunas, mis põhineb kolmel mehhanistlikul hüpoteesil.

I hüpotees: H-sidemete katkemine kõrge rõhu toimet on seotud hüdraatvee sisseimbumisega valgu hüdrofoobsesse keskkonda, kus polaarsed vee molekulid võistlevad edukalt B850 BChl a molekulidega H-sidemete ligandi rolli pärast (vt Joonis 8, lk 24).

II hüpotees: Trp UV fluorestsents on sobiv optiline marker antennide hüdratiseerimisprotsesside jälgimiseks.

Valkude hüdratiseerimisprotsessid toimuvad valk-vesi piirpinnal. Sarnaselt teiste membraanvalkudega kogunevad valgust koguvate antennide piirpindadele aromaatsed aminohappejäägid, sh Trp. Seda kinnitavad olemasolevad LH2 ja LH1 valkude kristallstruktuuri andmed (Koepke jt., 1996; McDermott jt., 1995; Papiz jt., 2003; Niwa jt., 2014; Yu jt., 2018a). Trp fluorestsents (eelkõige tema spektri maksimum) on tundlik keskkonna polaarsuse suhtes (Lakowicz, 2006).

III hüpotees: Oodatav on positiivne korrelatsioon B850 BChl IR neeldumisjoonte ja Trp UV fluorestsentsi rõhunihete vahel.

III hüpotees järeldeb I hüpoteesist. Niivõrd kui võrd H-sidemete katkemine rõhu all on seotud valkude hüdratiseerimistingimuste muutustega, peaks see avalduma Trp fluorestsentsiriba rõhunihete ebaregulaarsuse kaudu.

Eelöeldust tulenevalt oli antud töö konkreetseteks eesmärkideks:

1. Kindlaks määrata optimaalsed tingimused Trp UV fluorestsentsi mõõtmiseks. Optimeerimine on vajalik, sest
  - (i) Trp fluorestsents seni uuritud kromoproteiinides on väga nõrk (kvantsaagis kirjanduse andmetel  $10^{-2} - 10^{-4}$ ). Selle põhjuseks on nii ergastuse kiire ülekanne Trp-lt naaberkromofooridele kui ka elektroni ülekanne Trp-lt temaga seotud polüpeptiidahelale (Lakowicz, 2006);
  - (ii) UV-ergastus teadaolevalt lagundab orgaanilist ainet, sh denatureerib valkuseid;
  - (iii) Trp fluorestsentsi omadusi fotosünteesis valgustkoguvates antennides, samuti UV valguse mõju antennivalkude omadustele pole seni detailselt uuritud.
2. Leida ja analüüsida H-sideme katkemisega seotud võimalikku korrelatsiooni valgulise ja pigmendilise optilise markeri vastavate UV ja IR spektrite rõhunihete vahel.



## 4 Materjal ja metoodika

### 4.1 Uuritavad proovid ja kasutatud kemikaalid

Töös uuriti kahte objekti, *Rba. sphaeroides* CrtC<sup>-</sup> neurosporeeni mutandist isoleeritud LH2 kompleks ning *Tch. tepidum* metsiktüüpi tüvest isoleeritud LH2 kompleks. Esimene neist oli nn põhiobjekt, kus B850 neeldumisspektri järgi oli varem jälgitud H-sidemete katkemist kõrge hüdrostaatilise rõhu all (Kangur jt., 2008a; Freiberg jt., 2012). Teine oli võrdlusobjekt, kus sarnastel tingimustel H-sidemete katkemist ei toimu (Kangur jt., 2020). Tegemist on palju uuritud mudelorganismidega. *Rba. sphaeroides* on üks enim uuritud fotosünteesiline purpurbakter (Croce jt., 2018); ka *Tch. tepidum* vastu on huvi jätkunud alates tüve isoleerimisest 1984. a. (Madigan, 1984) ning huvi on tõusnud just viimasel ajal seoses selle kompleksi erakordse termilise stabiilsusega (Suzuki jt., 2007). Proovimaterjali omadused on esitatud tabelina (Tabel 1, lk 34).

Proovimaterjali valikul tuli sarnaselt reaktiivide valikule arvestada UV optilise spektroskoopia eripäradega, sh UV-ergastuse lagundava mõjuga, materjalide läbipaistvusega UV piirkonnas, materjalide puhtusega UV valgusega ergastuvate luminesseeruvate lisandite suhtes. Viimane asjaolu nt välistab fotosünteesiliste vesiikulite kasutamise, mis võib sisaldada lisaks huvipakkuvatele antennivalkudele sadakond võõrvalku koos nende aromaatsete aminohappejääkidega (ja vastava segava kiirgusega). Kõik orgaanilised materjalid kiirgavad UV-valguse all. Seetõttu nõuavad UV-valguse all tehtavad katsed piinlikku puhtust ja suurt hoolikust.

Kasutatud proovimaterjali ja lahuste valikul oli eesmärgiks valida komponendid, mis püsiksid stabiilsena ergastuslaseri mõjuväljas ja kiire rõhu tõstmise katsetes ning säilitaks uuritava antennikompleksi *in vivo* omadusi ja funktsionaalsust kogu mõõtmise käigus. Laguproduktide vältimiseks valiti ka proovi alikvoodid, mis olid läbinud võimalikult vähe külmutus-sulatus tsükleid ning valgulahuste pikaaegne säilitamine toimus -78 °C juures.

Katsetes kasutati järgmisi kemikaale:

1. Detergent LDAO (laurüüldimetüülamiin N-oksiid)
2. Detergent DDM (n-dodetsüül β-D-maltosiid)
3. Puhver HEPES (4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape), pH=7,5
4. Puhver Tris-HCL (tris(hüdroksümetüül)aminometaan-hüdrokloriid), pH=7,5
5. CaCl<sub>2</sub>, valke stabiliseeriv sool *Tch. tepidum* lahustes

**Tabel 1. Kasutatud proovilahuste omaduste kokkuvõte.**

| Antennkompleks                | <i>Rba. sphaeroides</i> CrtC <sup>-</sup> LH2  | <i>Tch. tepidum</i> WT LH2   |
|-------------------------------|--|--|
| Koostis                       | ( $\alpha_1\beta_1(\text{BChl } a)_3\text{Kar}_1$ ) * 9  | ( $\alpha_1\beta_1(\text{BChl } a)_3\text{Kar}_1$ ) * 8  |
| Tüve genoom                   | CrtC <sup>-</sup> , neurosporeeni mutant   | metsiktüüpi  |
| Lahus                         | 1. 20mM HEPES puhver, pH=7,5<br>2. 0,1% LDAO, tugev ioonne detergent võrdlemisi suures kontsentratsioonis              | 1. 20mM Tris-HCl puhver, pH=7,5<br>2. 0,05% DDM, detergent<br>3. 50 mM CaCl <sub>2</sub> , stabiliseerija              |
| Lahuse konts.                 | OD <sub>B800</sub> =0,48; C <sub>B800</sub> = 4,94 µmol/L<br>OD <sub>B850</sub> =0,63; C <sub>B850</sub> = 4,88 µmol/L | OD <sub>B800</sub> =0,70; C <sub>B800</sub> = 7,20 µmol/L<br>OD <sub>B850</sub> =0,96; C <sub>B850</sub> = 7,43 µmol/L |
| Isoleeritud LH2 päritolu      | Sheffieldi Ülikooli C. N. Hunteri töörühm Suurbritannias.  | Jaapani Ibaraki Ülikooli Z.-Y. Wang-Otomo rühm.  |
| Proovi eripära                | Rõhu mõjul toimuv jälgitav ja pööratav H-sideme katkemine  | Kõrge termodünaamiline stabiilsus  |
| LH2 röntgen-kristallstruktuur | Lahendamata, analoogiks peetakse <i>Rhodopseudomonas acidophila</i> struktuuri (McDermott jt., 1995; Papiz jt., 2003). | Lahendamata, aga analoogiks peetakse <i>Phaesporillum molichianum</i> struktuuri (Koepke jt., 1996).                   |
| Puhtuseaste                   | Kõrgeima puhtusega LH2 fraktsiooni, kus LH1 lisand on minimaalne   |  |
| BChl markerid                 | B800 neeld. (800 nm, 12500 cm <sup>-1</sup> ); B850 neeld. (850 nm, 11765 cm <sup>-1</sup> )                           |  |
| Valgu marker                  | Trp fluorestsents (~330 nm, 30300 cm <sup>-1</sup> )   |  |

Lahuse kontsentratsioon leiti eksperimentaalselt määratud neeldumise (OD) kaudu, kasutades Lambert-Beer'i seadust ( $A = \epsilon lc \rightarrow c = A/\epsilon l$ ), milles teemantalasi tihenduse kõrguseks  $l=400 \mu\text{m}=0,04 \text{ cm}$ ; BChl *a* ekstinktsioonikoefitsient  $\epsilon$  leiti kirjandusest,  $\epsilon_{\text{B800}}=2430000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ja  $\epsilon_{\text{B850}}=3230000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (Saga jt., 2016). *Tch. tepidum* B800 ja B850 ekstinktsioonikoefitsienti ei ole määratud, kuid kasutati  $\epsilon$  väärtust.

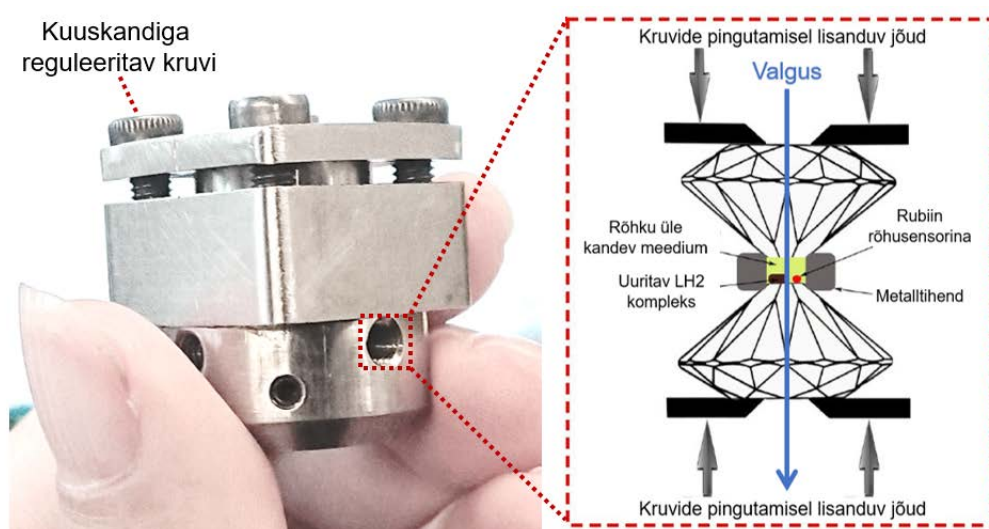
Membraanvalkude vesikeskkonnas uurimiseks on tarvilik kasutada detergente, et takistada uuritavate valkkomplekside agregatsiooni. Antud töös on kasutuses detergentid LDAO ja DDM. *Rba. sphaeroides* CrtC<sup>-</sup> membraanist isoleeritud LH2 lahustati 20mM HEPES puhvris (pH=7,5), kuhu oli lisatud 0,1% detergendi LDAO. *Tch. tepidum* WT membraanist isoleeritud LH2 lahustati 20mM Tris-HCl puhvris (pH=7,5), kuhu oli lisatud 0,05% detergendi DDM. DDM on kõige sagedamini kasutatud detergent nii isoleerimise kui kristalliseerimise kategoorias. DDMi mitselli tekkimiseks vajalik kontsentratsioon (MCM) on võrdlemisi madal, 0,0087% / 0,17 mM (Stetsenko ja Guskov, 2017). DDM on sageli kasutusel ka kuna erinevalt paljudest detergentidest ei muuda see valke lahuses ebastabiilseks ning on võrdlemisi odav (Skvarnavičius jt., 2017). LDAO (tuntud ka kui DDAO, dodetsüüldimetüülamiin oksiid) on võrdlemisi tugev detergent, see on olnud kristalliseerimiseks kasutusel alates 1984. aastast ning on viies kõige enim valgu uurimisel kasutatud detergent (Stetsenko ja Guskov, 2017).

Bioloogilistele molekulidele mõõtmiste ajaks stabiilse keskkonna loomiseks kasutati bioloogilisi puhvreid – HEPES (*Rba. sphaeroides*) ja Tris-HCL (*Tch. tepidum*). Antud töö kontekstis olid need sobilikud, kuna mõlemal puhvril on integraalsete membraanivalkude jaoks sobilik happesus valkude lahustumiseks ning stabiilsuseks (pH=7,5), need ei läbista membraane, neil on väike mõju bioloogilistele molekulmehhanismidele, keemiliselt stabiilsed, käitlemine ning ettevalmistamine toimub normaaltingimustes ning optiliste uuringute seisukohalt on tähtis, et neil on võimalikult madal nähtava ning UV valguse neelduvus (Good jt., 1966), mis aitab spektrite analüüsi segavat lisafooni võimalikult madalana hoida.

## 4.2 Seadmed ja tarvikud

### 4.2.1 Teemantalasi-rõhurakk

Teemantalasi-rõhurakk (Joonis 11) kujutab endast kahest teemantalasist ja nende vahel olevast metalltihendist koosnevat seadet, mida saab kruvisid pingutades kokku suruda sellisel moel, et teemantidest alasite vahele jääv proovilahus jääb kõrge rõhu alla. Läbi teemantide on võimalik proovile suunata valgust ja jälgida erinevate spektroskoopiliste kostete abil rõhu toimet proovile. (Jamieson jt., 1959).



**Joonis 11. Teemantalasi-rõhurakk.** Vasakul on toodud kogu seade ja paremal Song ja Dong 2011 a skeemi põhjal mugandatud lähivaade terasest rõhuraku kokkusurutavate silindrite vahel asuvast teemantalasist, mille otsade vahele paigutatud kettakujulise metallist tihendis olev puuritud auk mahutab ~300 nanoliitrit LH2 lahust.

Proovilahusele rõhu tekitamiseks kasutatud teemantalasi-rõhurakuga (Kat# D-02, Diacell Products Ltd) tekitati rõhkusid vahemikus ~ 0,001–12 kbar (0,0001–1,2 GPa). Rõhurakus püsivalt +23±0,5 °C hoidmiseks kasutati termostaati Haake F3 (Haake). Teemantide vahele tihendiks asetatud metallist plaadi keskele on puuritud auk, kuhu pipeteeritakse uuritav proovilahus (~0,3 µl) ning lisatakse rubiinikristall(id) (Syassen, 2008; RSA Le Rubis SA) in situ rõhu mõõtmiseks. Käesolevas töös kasutati ~400 µm sügavusega tihendit.

Rubiin, kroomi sisaldav alumiiniumoksiidi ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{:Cr}$ ) ehk korundi punane variant, on teemantalasi-rõhurakkudes kõige sagedamini rõhusensorina kasutatav mineraal. Rubiini luminesentsispektris eristuvad 2 joont ( $R_1$  ja  $R_2$ ), mille asukoht on lineaarselt tundlik nii rõhu kui temperatuuri suhtes (Syassen, 2008). Temperatuuri mõju elimineerimiseks kogu rõhurakk termostateeriti  $+23\pm 0,5$  °C ( $293,15\pm 0,5$  °K) juures kasutades Haake F3 termostaati. Mõõtmistes kasutati rubiini  $R_1$  luminesentsi joont, mille lainepikkusel temperatuuril 24,85 °C ja rõhul 1 atm on 694,25 nm ( $14404,033\text{ cm}^{-1}$ ) ja nihkekiirus  $-0,768\text{ cm}^{-1}/\text{kbar}$  ( $+0,036\text{ nm/kbar}$ ) (Grasset, 2001). Niivõrd väike nihkekiirus on juba mõõtmistehniliselt paras väljakutse, eeldades kõrglahutusega spektromeetri olemasolu. Lisaks tuleb määrata joone asukoht lainepikkuste absoluutskaalal. See saadakse võrdlusest spetsiaalse kalibratsioonilambi (Ne/Ar) kiirgusjoontega. Joonte tipu täpselt määramiseks lähendati mürane mõõdetud spekter sobiva funktsiooniga. Reeglina on selleks Gaussi funktsiooniga. Alles siis saab rubiini  $R_1$  nihkumise kaudu arvutada (Võrrand 1) teemantalasis proovile rakendunud tegelikku rõhku, mis katse käigus oli vaid hinnanguline. Arvutusmetoodika oli välja töötatud varasemalt.

#### Võrrand 1. Rõhu määramine rubiini kiirguse spektritelt.

$$P = (\lambda_{\text{rubiin}} - \lambda_{\text{reeper}} + \lambda_{\text{norm reeper}} - \lambda_{\text{norm rubiin}}) \cdot 0,19889 + 0,001$$

$P$  – rõhk, mis avaldub teemantalasi-rõhuraku kambris proovilahusele (kbar)

$\lambda_{\text{rubiin}}$  – teadmata rõhul määratud rubiini  $R_1$  riba  $\lambda_{\text{max}}$  (nm)

$\lambda_{\text{reeper}}$  – teadmata rõhul määratud reeperlambi Ne riba  $\lambda_{\text{max}}$  (nm)

$\lambda_{\text{norm reeper}}$  – normaalrõhul määratud reeperlambi Ne riba  $\lambda_{\text{max}}$  (nm)

$\lambda_{\text{norm rubiin}}$  – normaalrõhul määratud rubiini  $R_1$  riba  $\lambda_{\text{max}}$  (nm)

0,19889 – varasemalt TÜFI leitud konstant; näitab, et kui spektririba  $\lambda_{\text{max}}$  nihkub ühe CCD sensori maatriksi piksli külje pikkuse võrra, siis on toimunud rõhumuutus 0,19889 kbar (kbar/pikslis)

0,001 – atmosfäärirõhk, rõhumõõtmise katse nullpunkti korrektuuriks (kbar)

Mõõdetavas rõhupunktis määratud rubiini spektri nihe korrutatakse läbi rõhu muutuse konstandiga (0,19889 kbar/pikslis). Vastava konstandi kasutamine võimaldab otseselt töödelda algspektreid pikselskaalas, konstant ise on leitud, kasutades spektrograafi spektraalset lahutust aktuaalses spektriirirkonnas. Saadud tulemusele liidetakse normaalrõhu väärtus  $\sim 0,001$  kbar. Rubiini veapiirideks on erinevates allikates välja pakutud  $\pm 1,5\text{-}5\%$ , mis sõltub eri laborites kasutatud

metoodikast (Syassen jt., 2008). Antud töös kasutati rõhku vahemikus ~0,001-11 kbar, ning eelnevalt kirjeldatud metoodikaga määratud rõhu mõõtmise veapiirideks on hinnatud läbivalt  $\pm 0,02$  kbar. Rubiini luminesentsi abil rõhu määramine on TÜFI laboris kasutatavate metoodikate jaoks välja töötatud varasemalt ja olnud kasutuses pikalt ning kasutuses kui standardne metoodika.

#### 4.2.2 Barospektroskoopiline mõõteseade

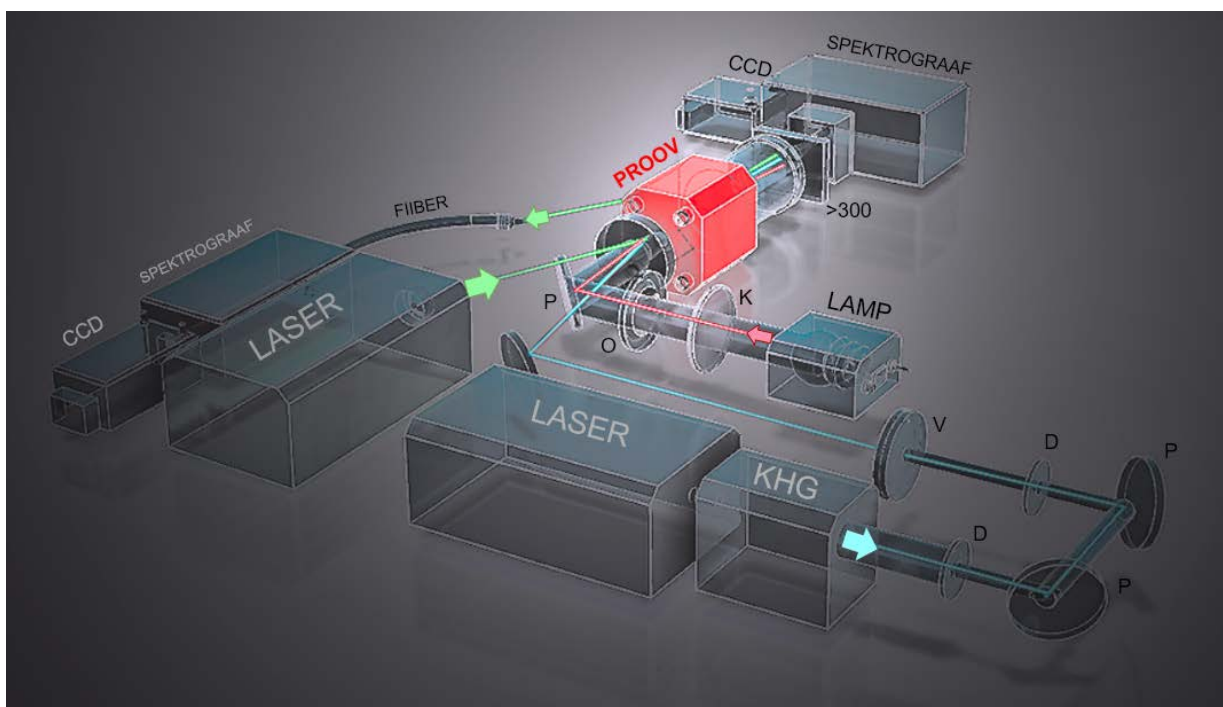
H-sidemetes rõhu-häirituse esilekutsumiseks ning UV-IR spektrite mõõtmiseks olid TÜFI biofüüsika laboris liikuvate komponentidega seadmed, mida vastavalt katsetele ümber ehitati, et neid häälestada ja täiendada, kuid põhimõtteline skeem jäi seadmel samaks (Joonis 12, lk 39; detailsemalt Joonis 25, lk 86).

LH2 IR neeldumise (B800, B850) ning UV fluorestsentsi (Trp) spektrid mõõdeti kasutades 0,3 m fookuskaugusega topeltmonokromaatorit DTMc300 spektrograafi režiimis (Bentham Instruments), mille fotosensoriks oli termo-elektriliselt jahutatav CCD kaamera DU416A-LDC-DD (Andor Technology). Kaamera CCD (*charge-coupled device*) anduriga detekteeriti valguskvante ning digitaliseeriti algandmed. Objekti neeldumist uuriti spektri vahemikus 685-1000 nm ja fluorestsentsi vahemikus 240-560 nm.

Neeldumisspekter ( $A$ , *absorbance*) arvutati mõõdetud läbilaskvusspektri ( $T$ , *transmission*) kaudu,  $A = -\log(T)$ . Läbilaskvusspekter määrati proovist läbi suunatud kiire ja referentskiire omaduste erinevuse baasil (Yadav, 2005). Läbilaskvusspektrite mõõtmisel kasutati stabiliseeritud valge valguse volfram hõõglampi BPS100 (B&W Tek, Inc.), mille valguse objektile pääsemise hulka reguleeriti muudetava diameetriga diafragma ja filtrite abil.

Trp fluorestsentsi mõõtmisel kasutati ergastamiseks kõrge sagedusega (76 MHz) femtosekundilisi valgusvälke genereerivat Ti:safiir laserit Mira-900F (Coherent). Selle laseri infrapunasest kiirest genereeriti sagedust kahekordistades 290 nm UV kiir kolmanda harmoonilise generaatoriga (KHG) HarmoniXX (APE Angewandte & Elektronik GmbH).

Rõhu arvutamise eesmärgil ergastati proovilahuses vabalt paiknevad mikroskoopilised rubiinid (RSA Le Rubis SA) 532 nm Nd:YAG pideva tahkiselaseriga väljundvõimsusega 3 mW (Viasho). Rubiini kiirgusspektri detekteerimiseks kasutati optilise fiibersisendiga kõrglahutuslikku spektrograafi THR 1500 (Horiba Jobin Yvon, Inc.), mille sensoriks oli termo-elektriliselt jahutatav CCD kaamera DV420A-OE (Andor Technology).

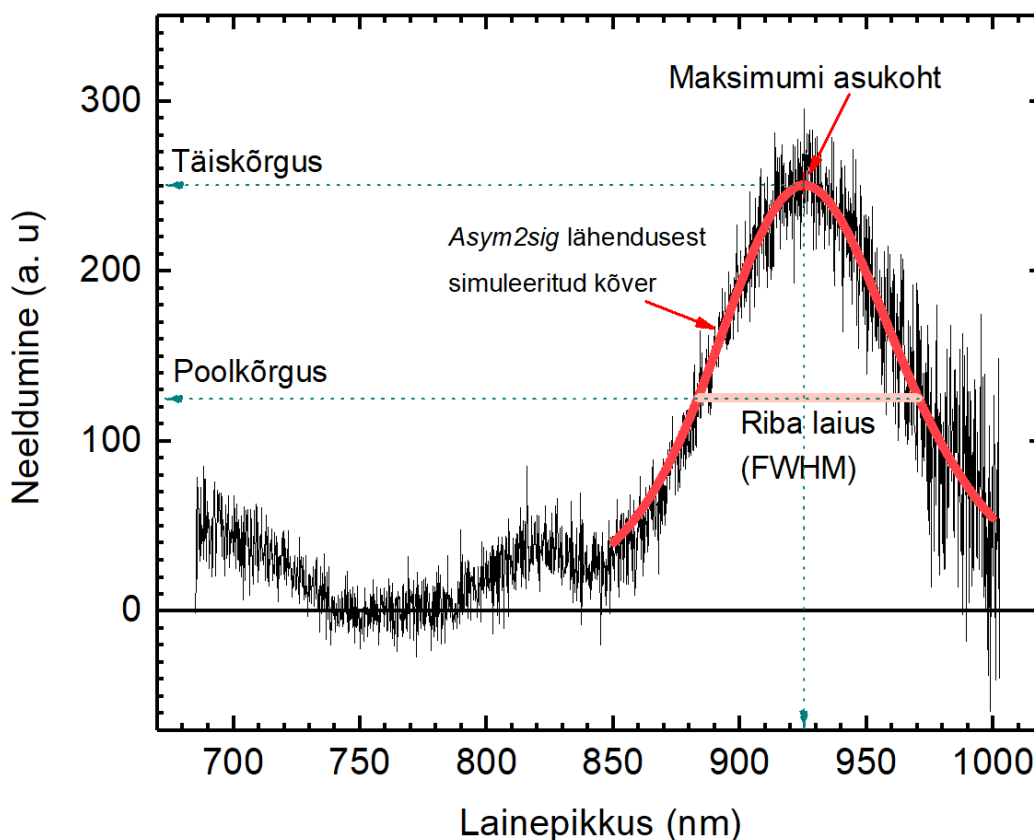


**Joonis 12. Barospektroskoopilise mõõteseadme lihtsustatud skeem (detailsem kirjeldus on toodud Joonis 25, lk 86). Termostateeritud teemantalasi-rõhuraku (punane) ~300-nanoliitrise mahutavusega rõhukambrisse lisati uuritav lahus ja rõhusensorina mõned rubiinikristallid. Rubiini ergastamiseks kasutati 532 nm rohelist laserit (roheline nool). Rubiini kiirgus suunati optilise fiibri kaudu joonise vasakul pool kujutatud spektrograafi ja registreeriti CCD kaamera abil. Trüptofaani kiirguse ergastamiseks kasutati kolmekordistatud sagedusega Ti: safiir laserit (sinine nool). Trüptofaani kiirgus juhiti analüüsiks joonise ülaosas kujutatud spektrograafi ning registreeriti CCD kaameraga. Lisaks spektrograafile takistas erinevatelt pindadelt hajunud ergastuslaseri footonite registreerimist >300 nm läbilaskvusega filter. IR neeldumise mõõtmiseks kasutati pideva spektriga hõõglampi (punane nool) ning sama spektrograafi ja CCD andurit nagu UV mõõtmistes. Valguskiirte manipuleerimiseks kasutati muudetava avaga diafragmasid (D), peegleid (P), läätsi (K) ja elektromehaanilisi klappe (V, O).**

## 4.3 Andmete analüüs ja metoodilisi märkusi

### 4.3.1 Andmete analüüs

Spektrite analüüsi eesmärgiks oli eemaldada taustamüra, leida müra seest uuritavate markerite spektriribad (Trp, B800, B850) ning määrata nende maksimumi asukoht ja riba täislaius poolel kõrgusel (FWHM, *full width at half maximum*) (Joonis 13). Riba maksimumi asukohta on võimalik pärast X-telje kalibreerimist kasutada lainepikkuse skaalal ( $\lambda_{\max}$ , nm) ja sellest teisendatult ka energiaskaalal ( $\nu_{\max}$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ). Riba laius määrati energiaskaalal ( $\text{cm}^{-1}$ ) maksimumide vahena, ning seda ei saa lainepikkuse skaalasse otse teisendada. Riba laienemine näitab konfomeeride heterogeensuse tõusu, sest sageli põhjustab erinev konformatsioon ka nihkunud üleminekuenergia maksimumi, mille tõttu kogu riba laieneb normaaljaotuse sarnaselt või ainult ühest küljest, näidates teatud energiaga konfomeeride arvu tõusu (Barth, 2007).



Joonis 13. Riba maksimumi asukoht ( $\lambda_{\max}$ , nm) ning riba täislaius poolel kõrgusel (FWHM).



Müra eemaldamine õnnestus osade katsete puhul, aga osadel mitte, olenevalt mürafooni stabiilsusest. Katsete spektrid, mille taustafoon kõikus katse jooksul, signaal kadus keset katset ja taastus hiljem ebakorrapäraselt kas rõhuraku geomeetria nihke või muudel teadmata põhjustel, jäeti tervikuna kõrvale. Põhjalikumalt analüüsiti vaid katsete tulemusi, millel oli võimalik taustafoon välja filtreerida kõikidest katsepunktidest ning rõhurakk püsis stabiilsena.

Katsetel kogutud spektrite analüüsiks kasutati tarkvara OriginPro 2017 v. 9.4 ning Microcal Origin 6 v. 6.0. (OriginLab, Inc.). Analüüsimiseks leiti eksperimendis detekteeritud spektraalsetest algandmetest uuritav spektriosa, kasutades selleks kalibreerimiskõveraid ja puhvri-detergendi fooni lahutamist. Mürafoonist eraldatud spektriosas analüüsiti igas katsepunktis ja iga spektri kõik ribad käsitsi, kuna tegemist on väljaarendatava meetodikaga ning peamiselt kuna rõhusõltuvuses muutub spektrite asukoht ning kuju, siis leiti, et enamiku spektritel on ribade ükshaaval lähendamine kõige täpsem. Igale ribale on leitud lähenduskõver spektriosa kaudu, milles oli eeldatavalt kõige vähem mõjutusi kõrvalasuvatelt ribadelt. Spektraalsest mürast ja parajasti mitte analüüsitavatest ribadest eraldatud spektriosa lähenduskõvera parameetrite alusel koostati simuleeritud kõver, mis laiendati simuleeritult ka mürasemasse või mitme spektririba segunenud alasse ning selle abil leiti graafikult keskmist mürafooni lahutades riba täiskõrgus, poolkõrgus ning seeläbi lõpptulemusena riba laius (FWHM). Samuti leiti OriginLab Peak Analysis abil spektririba maksimum simuleeritud kõveralt arvutades, mitte graafikult mõõtes. Varasemalt oli teada (Lotte jt., 2004) ning ka seekord paistis eriliselt silma Trp spektrite puhul, et otse spektri graafikult ei ole võimalik riba maksimumi asukohta täpselt määrata, ning analüüsi puhul on tarvilik inimfaktor just madalate signaalide ja segude analüüsil, kuna müra eristamine uuritavast spektrist on vajab abstraktset mõtlemist. Seetõttu pole analüüsimetoodika automatiseerimine antud juhul eesmärgiks seatud, eriti mitte meetodika arenduse faasis.

Spektriribade lähendamiseks ja simulatsiooniks sobiv funktsioon valiti olenevalt algandmetest moodustuva spektririba omadustele, eelistati võimalikult väheste iteratsioonide abil saavutatud lähendusi, millel oleks algandmete suhtes võimalikult väike erinevus ja kõrge  $\chi^2$ , ning korduval analüüsil tekiks sarnane lähendus mitmel erineval inimesel.

Reeperjoon (Ne) ning rubiini kiirguse spektrijoon ( $R_1$ ) on sümmeetrilised, puhtad ja lihtsa iseloomuga, need lähendati Gaussi funktsiooni kasutades ning see möödus igas katses rutiinselt ja ilma probleemideta, ning oli võimalik ka automatiseeritult analüüsida. Leiti, et käsitsi määratult olid erinevate analüüsijate tulemuste erinevused väiksemad ( $\pm 0,0-0,05$  kbar, keskmiselt  $\pm 0,02$

kbar, SD=0,02), siis automatiseeritud analüüsis tekkisid OriginLab erinevaid versioone kasutades suuremad erinevused ( $\pm 0,0-0,22$  kbar, keskmiselt  $\pm 0,08$  kbar, SD=0,07). Oleneb olukorrast, kumb meetodika omadus on parajasti tähtsam, kas kiirus või täpsus. Kuigi erinevused ei olnud suurte rõhkude seisukohalt väga suured, siis meetodika arenduse faasis eelistati täpsemat, aga ka aeganõudvamat käsitsi analüüsi.

Ülejäänud spektrite analüüsideks (BChl, Trp) kasutati asümmeetrilist topelt sigmoidset lähenduskõvera funktsiooni (OriginLab: *Asym2sig*). B800 ja B850 eksitonide neeldumisribade lähestikku asumise tõttu oli tarvilik spektrisidumi dekonvolutsioon, spektrite sidumist leiti alustuseks komponent-spektrijooned, mille põhjal koostati simuleeritud kõverad, millelt määrati OriginLab *Peak Analyseri* arvutuse kaudu spektraalparameetrid asümmeetrilistelt komponentidelt. Trp fluorestsentsi spektrijoon oli samuti asümmeetriline, kuid vaid ühe maksimumiga, mis määrati sarnasel meetodil.

Kasutatud ühikute konversiooni täpsustuseks - CCD sensor detekteerib footonite energiad neid pikslite võrgustikule jaotades, maatriks moodustub pikslitest, ning lainepikkuse skaala tuleb ise kalibreerida igas katses. Seega vahetult sensorist salvestatud spektrid on pikslite skaalas (px). Skaala paigutatakse hiljem lainepikkuse ühikutesse (nm) standardspektrite abil kalibreerides. Tulemusi esitatakse enamasti footoni energia ( $\nu$ ) ühikutes, pöördsentimeetrites ( $\text{cm}^{-1}$ , *inverse centimeters*,  $\text{cm}^{-1} = 10^7 / \text{nm}$ ;  $E=h\nu=hc/\lambda$ , milles  $\lambda$ -lainepikkus,  $h$ -Plancki konstant,  $\nu$  sagedus,  $c$  valguse kiirust vaakumis), mis on lainepikkuse skaalaga pöördvõrdeline suurus ning peegeldab sihtmolekulis neelduvat või kiirguvat energiaportsjonit otsesemalt, kui lainepikkus. Pöördsentimeetreid eelistati, kui oli vajalik kvantiteerida energiataseme muutusi ning lainepikkuse skaalat eelistati andmetöötluse käigus, kuna see on sarnasem algandmete pikslites tekkinud skaalale ning otsevaates lihtsam jälgida ja kalibreerida. Rõhu ühikuna kasutati enamasti kilobaari (kbar), ning mõõtmised toimusid vahemikus 0,001-12 kbar. Kirjanduses kasutatakse sageli ka suurust megapaskal (MPa), mille kontekstis antud töös uuritud rõhud jäävad 100-1200 MPa vahemikku. Normaalingimustel tehtava katse rõhk on  $\sim 1$  baar ( $1 \text{ atm} = 1,01325 \text{ bar} = 101\,325 \text{ Pa}$ ), kuid nagu eelpool toodud, siis rõhurakus on algrõhk mullide eemaldamise põhjusel tavaliselt natuke suurem.

Spektrite analüüsist tuletatud suurustest tekkinud rõhusõltuvuste lähendamiseks kasutati enamasti polünoomseid funktsioone, siinkohal kerkis ka probleem, *Tch. tepidum* rõhusõltuvusi oli võrdlemisi lihtne lähendada (OriginLab 2017: *Polynomial fit - Poly2*), kuid *Rba. sphaeroides*

suuremaid tagasinihkeid sisaldavate rõhusõltuvuste kogu vahemiku ühe funktsioonina lähendamine ei olnud selline, millega võis rahule jääda ja käesolevas töös jaotati seetõttu eksperiment kaheks erinevaks rõhuvahemikuks ( $\sim 0\text{--}5$  kbar ja  $5\text{--}12$  kbar). Antud puhul võivad selgust tuua järgnevad korduskatsed, mis aitaks keskmistada kõrgete rõhkude mõõtmisi ( $5\text{--}12$  kbar vahemikus), mis on eriti vajalik UV-kiirguse puhul. Kiirgus- ja neeldumisribade maksimumide ja riba laiuse mõõtemääramatuseks arvestati TÜFI biofüüsika labori varasemate katsete ning CCD sensori tundlikkuse alusel määratud veapiire  $\pm 0,5$  nm ( $\text{cm}^{-1}$  skaalasse teisendades omistab nm erinevaid arvulisi väärtusi, vastavalt mõõdetava spektripiirkonna laine energiale võib see infrapuna puhul olla  $\sim \pm 8$   $\text{cm}^{-1}$  ning ultravioletil  $\sim \pm 50$   $\text{cm}^{-1}$ ) ning nagu varasemalt toodud, siis rõhu määramatuseks oli  $\pm 0,02$  kbar. UV-spektrite mõõtmise korratavust on täpsustatud tulemustes (Ptk 5.2.3, lk 55).

#### 4.3.2 Täiendavaid metoodilisi märkusi

Proove säilitati alikvootidena sügavkülmas  $-78$  °C juures, ning sulatatati ja lahjendati vahetult enne mõõtmisi. Mõõtmisteks valiti proovid, mis olid sulatus-külmutus tsükleid võimalikult vähe läbinud.

Enne igat rõhusõltuvuse katset mõõdeti teemantalasi-rõhurakus puhvri-detergendi neeldumise ning kiirguse spektrid, et proovimaterjali spektreid analüüsides oleks võimalik puhvri ja raku mõju arvestada. Pärast puhvri-detergendi segu spektrite mõõtmist pipeteeriti sulatatud LH2 lahjendusest  $\sim 0,3$   $\mu\text{l}$  teemantalasi-rõhurakku. Seejärel fikseeriti rõhurakk barospektroskoopilise seadme ettenähtud mõõtmisalasse, kus saab rõhuraku teemantakendest läbi suunata valgusallika kiire (halogeenlambi, reeperlambi või laseri).

Katse käigus tõsteti rõhku  $\sim 0,5$  kbar sammuga ning vahetult iga tõstmise järel toimus spektrite mõõtmine. Rõhu tõstmise lõpetati tavaliselt  $\sim 10\text{--}12$  kbar juures, kuna leiti, et kõik uuritavad muutused olid selleks hetkeks toimunud.

Igas rõhupunktis detekteeriti nelja erineva spektri andmed, mis võttis kokku  $\sim 10$  min:

1. Rubiini spekter rõhu väärtuse täpseks määramiseks,
2. Ne/Ar reeperlambi referentsspekter rubiini lainepikkuse skaala kalibreerimiseks,
3. uuritava proovilahuse ultravioletse (UV) fluorestsentskiirguse spekter,
4. uuritava proovilahuse infrapuna (IR) neeldumise spekter.

Ühe spektri kogumise ajaks oli 20 sekundit, mille jooksul valgustati proovimaterjali ning toimus footonite detektsioon CCD sensori maatriksil. Kogumise ajaks valiti 20 sekundit, kuna lühem aeg madaldas signaali ning pikem ergastuse aeg mõjus lahusele lagundavalt või kiirgust ja neeldumist kustutavalt. Pärast ühe spektri kogumist toimus seadme ümber lülitamine järgmisesse mõõtesüsteemi, nagu on täpsemalt kirjeldatud seadmete peatükis (Joonis 12, lk 39). Kõikide mõõtmiste ja optika ümberlülituste läbiviimiseks kulus ühes rõhupunktis 5-10 min. Metoodika hilisemas järgus selgus, et tasus eelistada 10 min tsükleid, kuna liiga lühikeste pauside puhul võib juhtuda, et Trp kiirgus kustub liigse ergastuse toimel. Trp vajab taastumiseks aega (Joonis 24, lk 62), kuid samas tuleks vältida liialt pikki katseid, kuna leiti, et proovimaterjali tavatingimustel lagunemine võib samuti signaali segama hakata. Samuti leiti, et rõhu tõstmise järel ei anna eelist, kui anda rõhule pikemat mõjumise aega enne spektrite mõõtmist, sest mõõtmistsükli pikenemisel on negatiivne mõju valgulahuse stabiilsusele. Eeltoodu alusel on hetkeseisuga leitud, et UV-lagundava mõju vältimise ja CCD sensorile piisavas koguses footonite kogumise saavutamise kompromissina kasutusel olevaks tsükli pikkuseks ~10-min.

Rõhutsükli viimase etapina langetati rõhku 2-4 rõhupunktina, millest igas määrati proovilahuse taastumise hindamiseks eeltoodud neli spektrit ja kõige viimasena taastati normaalrõhk rõhurakku vabaks lastes. Rõhurakus tekkis normaalrõhk alles viimases punktis, kuna enne katset oli vajalik lahuse kambri mikroskoopiliste õhumullide eemaldamiseks sulgeda rakk tihedalt, mis põhjustab normaalrõhust kõrgema rõhu ~0,1 kbar, normaalrõhk on 0,001 kbar. Seniste andmete põhjal on LH2 rõhu-häiritusega esile kutsutud muutused pööratavad nii IR-spektroskoopias (Kangur jt., 2008a; Kangur jt., 2020) ja ka UV-spektroskoopias (Joonis 23, lk 61) ning seetõttu on õnnestunud eksperimendi eelduseks, et pärast rõhutsükli toimub LH2 renaturatsioon ning ka spektrimaksimumi asukoht, proportsioonid ning laius on taastunud (vt erandeid Joonis 22, lk 60). Intensiivsuse taastumine täiel määral ei ole eeldatud, proportsionaalne signaali kadu on oodatav.

Metoodika arenduses on praeguseks leitud UV-uuringuteks sobilik ergastuse lainepikkus (20 sek), mõõtmise tsükli pikkus (10 min) ning proovimaterjal (*Tch. tepidum*, *Rba. sphaeroides*). Järgnevate eelkatsete jooksul on eesmärgiks välja selgitada, kuidas käesolevate vahenditega ühtlustada teemantalasi-rõhuraku mõju spektritele, sest viimasel ajal on kinnitust leidnud, et see võib ootamatult põhjustada signaali kadumist või tekkimist ergastuskiire geomeetria tõttu. Võimalikuks aga mitte eelistatud lahendusteks on rõhukontrolli sujuvama mehhanismi nagu nt gaasikompressoriga rõhuraku kasutamine, et vältida eksperimendi jooksul rõhuraku liikumist laserikiire suhtes, kuid kuna sellega kaasneb ka kogu rõhuraku ja ka alasi materjali vahetus

(teemant; safiir), seadmete paigutus ja seega teadmata efektid. Teiseks variandiks, mis on seni tehtud töö suhtes eesmärgipärasem, on jätkata kasutusel oleva rõhuraku spektritele avaldatud efektide uurimist. Kuna optilise seadme puhul on tegemist väga liikuva ja kombineeritud süsteemiga (Joonis 12, lk 39; Joonis 25, lk 86), siis on võimalik testida väga palju erinevaid variante.

UV-kiirguse meetoodika täiendamiseks võib olla vajalik ka neeldumisribade (nt BChl a Soret) mõju arvestamine Trp kiirgusspektri punasemas alas. Juhul kui peaks järgnevate katsete jooksul selguma, et Soret riba moodustavates bakteriklorofüllides neeldub osa Trp kiirguse pikemalainelisi footoneid, siis saab seda meetoodikas arvestada. Ligikaudsel hinnangul toimub Soret ja Trp punanihe rõhusõltuvuses piisavalt sarnase sammuga (nm/kbar), et võib eeldada, et Soret mõju Trp kiirgusspektrile on piisavalt ühtlane, et ei tekita näilisi järske Trp nihkeid, mille puhul oleks oht neid valesti tõlgendada. Soret mõju hindamiseks saaks uurida lühilainelisi neeldumisspektreid, millega ka alustati põgusalt (töös pole esitatud).

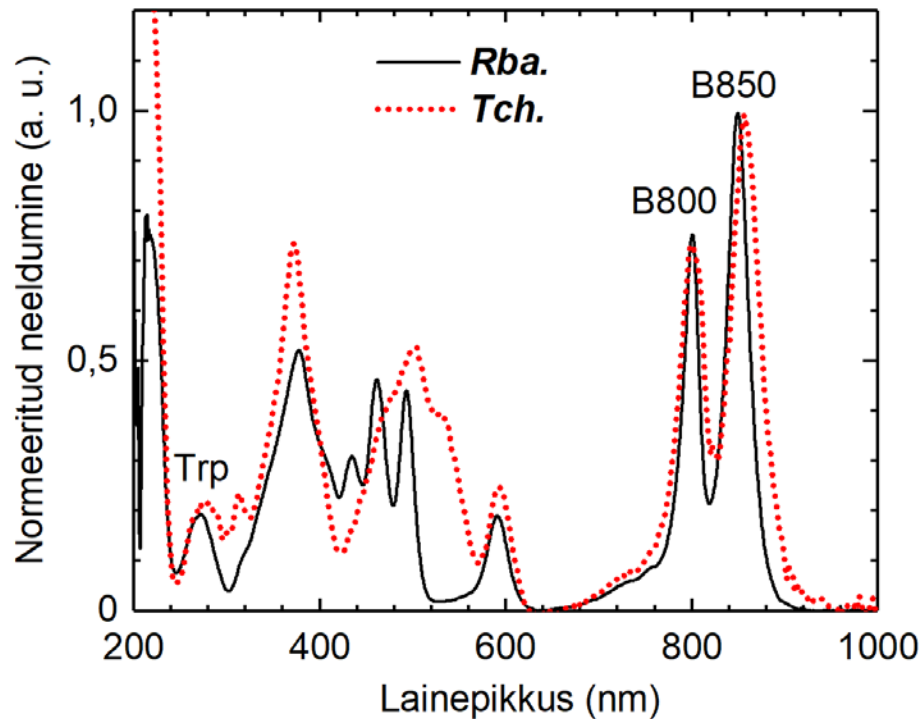
Proovimaterjali stabiilsuse osas võib olla erinevaid lahendusi. Hapniku oksüdatiivse mõju vältimiseks on vajalik rõhurakust eemaldada kõik mullid, kuid võib eeldada, et lahusesse jäävad hapniku jäägid. Katsete esimeses faasis prooviti antioksidandina kasutada ka askorbiinhapet, kuid ei leitud, et see oleks avaldanud negatiivset ega positiivset mõju, sest jätkus signaali juhuslik kõikumine sarnaselt varasemale. Praeguses meetoodika arengufaasis, kus on leitud võrdlemisi optimaalsed tingimused ergastuse ja lahuse osas, ei ole hapniku lagundav mõju enam esmajärguline, kuid üks hapniku vältimiseks on ette valmistatud võimalus ka kasutada proovilahuse rõhurakku laadimiseks lämmastiku keskkonda, kuid selleks pole veel vajadust kerkinud.

## 5 Tulemused ja arutelu

### 5.1 Bakterklorofüllidega seotud lähi-infrapuna neeldumine LH2 antennides

#### 5.1.1 Spektrite kirjeldus normaaltingimustel

Kuna oodatavad efektid avalduvad võrdluses referentssüsteemiga, siis on peamise uurimisobjekti (CrtC- *Rba. sphaeroides*) ning võrdlusobjekti (WT *Tch. tepidum*) katsete tulemused esitatud paralleelselt. LH2 spekter on ülevaate huvides toodud ka laias vahemikus (200-1000 nm) (Joonis 14), millest käesolevas töös uuriti B800 ja B850 ribasid. *Rba. sphaeroides* on võrreldes *Tch. tepidum* maksimumiga nihkes +1,7 nm (B800) ning -4 nm (B850). *Tch. tepidum* B800 riba on mõlemast küljest laiem, B850 on laienenud punasemast poolest (täpsustus järgmises ptk).



**Joonis 14. LH2 neeldumise ülevaatlik spekter koostati varasemate katsete andmeid kasutades (*Tch. tepidum*: Margus Rätsep; *Rba. sphaeroides*: Kõu Timpmann). Spektrid on normeeritud B850 ribade kõrguse järgi, arvestades proovide erinevat hajutamist.**

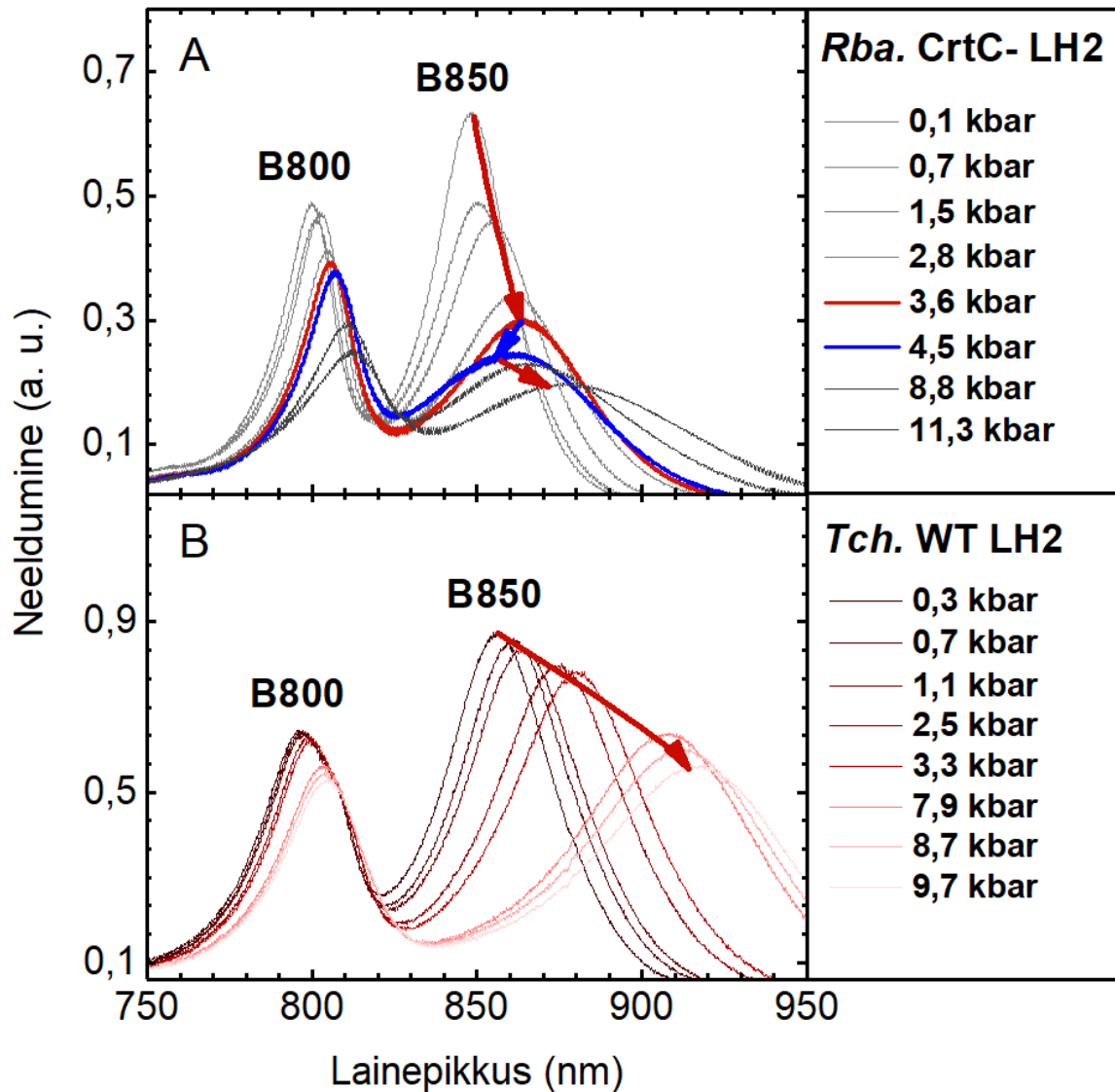
Taustainfona võib ka vajalik olla, BChl a neeldumises on *Tch. tepidum* spektris näha intensiivset Soret neeldumisriba (300-400 nm), mille lühemalainelisem osa on oma struktuuri poolest *Rba. sphaeroides* riba sarnane, välja arvatud 300-320 nm juures kerkiva väikese riba osas. Kuna selle asukoht tundub kokku langevat *Rba. sphaeroides* Soret madala väikese õlaga, võib see olla BChl

a neeldumine. Samuti võib see olla põhjuseks, miks *Tch. tepidum* Trp riba parem õlg on kõrgemale tõstetud. BChl a  $Q_x$  riba (~600 nm) kõrgem intensiivsus *Tch. tepidum* spektris on tingitud karotenoidide ja  $Q_x$  neeldumise osalisest kattuvusest. Karotenoidid iseenesest on uuritud liikidel erinevad, mille tõttu nende neeldumine (~400-600 nm) on väga erinev ja ei ole võrreldav.

Trp puhul küll ei kasutatud neeldumisspektreid, vaid kiirgust (vt Trp fluorestsentsi ptk), kuid meetodika huvides oli mõnel juhul vajalik ka neeldumise mõõtmine. UV spektrialas toimub LH2 sekundaarstruktuuride (200-220 nm) ja fluorofoorsete aminohappejääkide (Trp, Tyr, Phe) neeldumine (220-300 nm). Sealjuures nagu ka varem toodud, siis Trp ja Tyr neeldumine on 275-295 nm vahemikus osaliselt kattuv (Lakowicz, 2006), aga riba punasemat poolt (290 nm) sihtides oli võimalik Trp selektiivne ergastus.

### 5.1.2 Neeldumisspektrite rõhusõltuvus

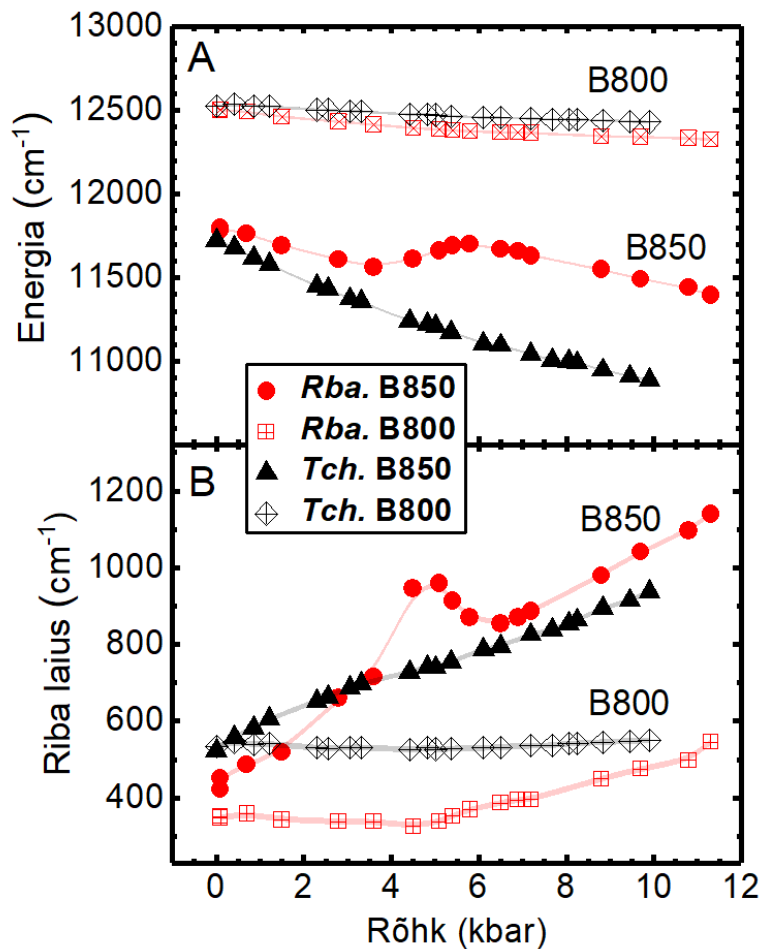
*Rba. sphaeroides* neeldumisspektrid määrati kuni 11,3 kbar (Joonis 15.A) ning *Tch. tepidum* puhul kuni 9,7 kbar (Joonis 15.B).



Joonis 15. Neeldumisspektrite rõhusõltuvus *Rba. sphaeroides* (A) ja *Tch. tepidum* (B) LH2 kompleksides. Nooled seovad B850 riba maksimume erinevatel rõhkudel. Selgelt on näha *Rba. sphaeroides* aset leidv H-sidemete katkemisest tulenev B850 maksimumi nihke järsk muutus punanihkest sininihkeks rõhkude vahemikus 3,6-4,5 kbar, samas kui *Tch. tepidum* B850 ribas jätkab ühtlast nihet punasesse.



B800 ja B850 neeldumisspektritelt (Joonis 15) määratud andmetest (Joonis 16) selgus, et varasemate tulemustega kooskõllaliselt (Kangur jt., 2008a; Kangur jt., 2012) toimus põhilisel uurimisobjekttil, *CrtC-Rba. sphaeroides* ~4 kbar alates B850 spektraalne sininihe, millele eelnes ja järgnes punanihe (Joonis 16.A). Punanihetega kaasnev aeglane riba laienemine kiirenes, sininihke ajal (Joonis 16.B). Rõhu toimetel tekkiva B800 ja B850 punanihke põhjuseks on, et struktuuri hüdrostaatiline kokkusurumine madaldab eksitoni üleminekuenergiat (ergastuse liikumiseks kulub vähem energiat) ja tugevdab eksitoninteraktsioone (BChl a kvantsidusus tõuseb) (Wu jt., 1997; Timpmann jt., 2001; Pajusalu jt., 2019). Erandliku sininihke põhjuseks on BChl-Trp H-sidemete katkemine (Kangur jt., 2008a).



**Joonis 16.** *Rba. sphaeroides* ja *Tch. tepidum* B800 ja B850 neeldumisribade asukoha (A) ja laiuse (FWHM) (B) rõhusõltuvus. Mõõtmismääramatus on  $\pm 0,5$  nm, millele energiaskaalas vastab  $\pm 7 - 8$  cm<sup>-1</sup> (vastab graafikul joone paksusele) ning rõhu puhul  $\pm 0,02$  kbar.

H-sidemete katkemise negatiivse kontrollina kasutatud *Tch. tepidum* B850 spektrid vastasid samuti varasematele tulemustele, rõhu mõjul toimus ühesuunaline ja lineaarse-sarnane punanihe (Joonis 16.A) ning ühtlane laienemine (Joonis 16.B). See kinnitab antud ekstremofiilse LH2 kõrget stabiilsust, mille H-sidemete võrgustikus ei teki drastilisi häireid ka 14 kbar rõhul (Kangur jt., 2020).

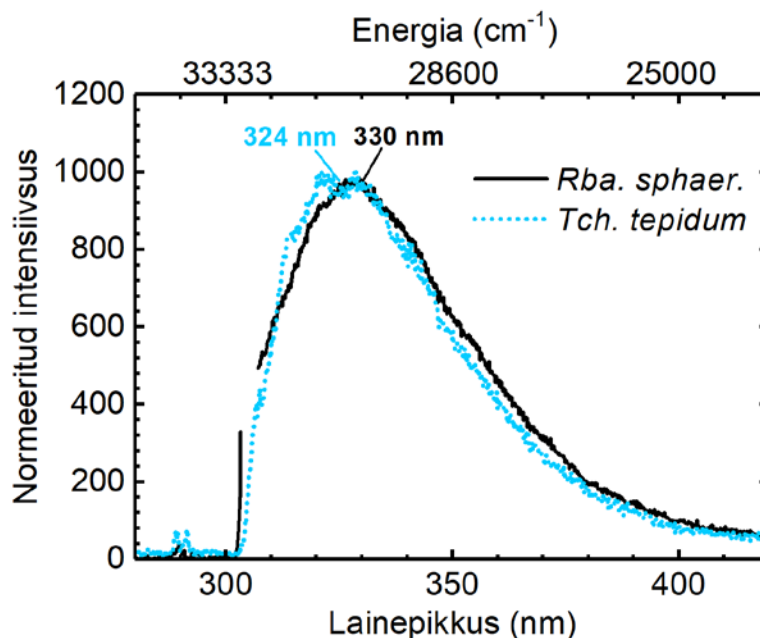
Kahe bakteriiliigi LH2 on rõhu suhtes stabiilsed, mida näitab nende denatureerimise pööratavus, kuid kromoproteiinis on selgelt erineva rõhutundlikkusega domeenid (Gall jt., 2003). B800 on vähem rõhust sõltuv, on hajusam ja pole tugevas vastasmõjus ja B850 on tihedas interaktsioonis ning ka deformatsioonidele tundlikum (Sauer jt., 1996). Normaalingimustel oli *Rba. sphaeroides* B800  $\lambda_{\max}=800$  nm ( $\sim 12500$  cm<sup>-1</sup>) ning *Tch. tepidum* 798,3 nm ( $\sim 12530$  cm<sup>-1</sup>), mis eelmistes katsetes olid vastavalt 800,7 nm (Kangur jt., 2012) ja 799,9 nm (Kangur jt., 2020). B800 nihkus ka käesolevas töös punasesse väikse sammuga (Joonis 16.A). Rõhutsüklis oli *Rba. sphaeroides* nihe 160 cm<sup>-1</sup> (+1 nm/kbar;  $\Delta\lambda_{\max}=11$  nm; lõpp  $\lambda_{\max}=810$  nm,  $\sim 12340$  cm<sup>-1</sup>,  $\sim 9,7$  kbar), ning *Tch. tepidum* nihe 100 cm<sup>-1</sup> (+0,6 nm/kbar;  $\Delta\lambda_{\max}=6$  nm; lõpp  $\lambda_{\max}=804,5$  nm,  $\sim 12430$  cm<sup>-1</sup>,  $\sim 9,7$  kbar). Käesolevas töös *Rba. sphaeroides* B800 riba  $\sim 4$  kbar riba laienemise kiirenemist (Joonis 16.B) ei ole varasemalt täheldatud ja seega vajab järgnevates korduskatsetes selgitamist, kas tegemist on artefakti või korduva mustriaga.

Riba laienemine viitab energiaseisundite heterogeensuse tõusule (Croce jt., 2018; Pajusalu jt., 2019). Kahe töös kasutatud purpurbakteri B800 ja B850 laiuses (FWHM) tekib märgatav erinevus (Joonis 16.B) - *Tch. tepidum* B800 ja B850 on laiem, kui *Rba. sphaeroides*. *Tch. tepidum* ribade kuni 40% suuremat laiust on toodud välja ka uuringutes, kus leiti, et tema LH2 struktuur võib olla paindlikum ning sisaldada erinevaid  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidide variantide kombinatsioone (Shi jt., 2015). *Tch. tepidum pucBA* allelele on leitud kolm, *Rba. sphaeroides* allelele kaks (Tabel 2, lk 84) (Uniprot). Laiem riba normaalingimustel näitab, et BChl liikumisvabadus on valgu sidumistaskus suurem, ning pärast arvatavat vee rõhu survele hüdrofoobsetesse taskutesse tungimist suureneb liikumisvabadus veelgi (Kangur jt., 2012; Golub jt., 2019). LH2 H-sidemete katkemise mehhanismi on selgitamata, kuid hüdrofoobsete taskute hüdraatumine rõhu survele on üheks tõenäoliseks variandiks (Luong jt., 2015) ning just seetõttu osutus vajalikuks analüüsida laiendamist ka LH2 UV spektri alasse, kus asub tuntud hüdraatumise osas tundlik (Lakowicz, 2006) optiline marker Trp, mida pole veel varem käesoleva töö kontekstis kasutatud.

## 5.2 Trüptofaaniga seotud ultravioletne kiirgus LH2 antennides

### 5.2.1 Trüptofaani fluorestsentsispektrid normaaltingimustel

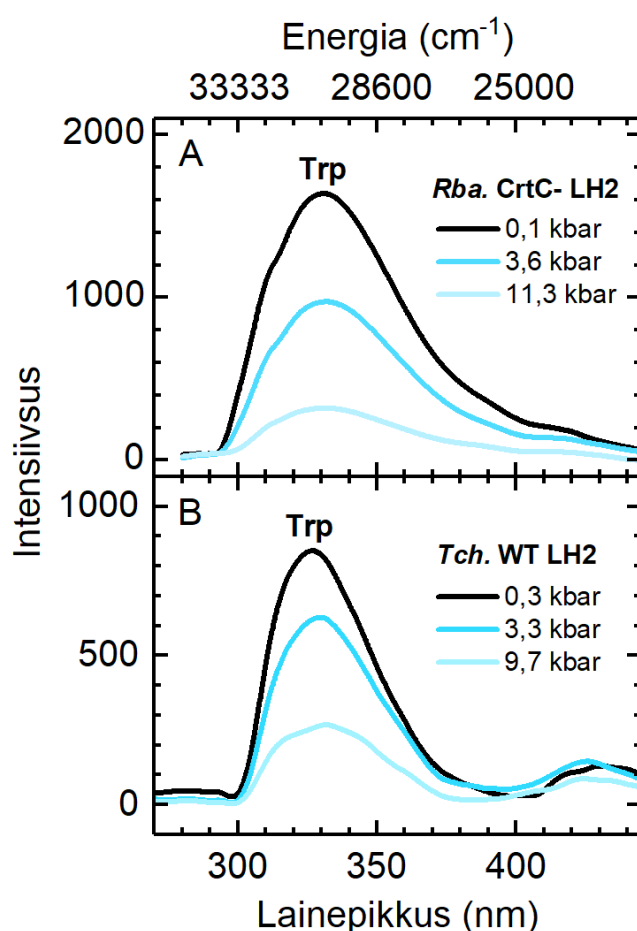
LH2 antennide Trp ergastati ~290 nm UV-laseriga ning fluorestsentsi spektrid mõõdeti vahemikus 300-450 nm. *Rba. sphaeroides* Trp kiirguse maksimumi asukohaks määrati  $330 \pm 0,5$  nm ( $\sim 30300$   $\text{cm}^{-1}$ ) ja *Tch. tepidum* WT LH2 puhul  $324 \pm 0,5$  nm ( $\sim 30800$   $\text{cm}^{-1}$ ) (Joonis 17), mis viitab sellele, et mõõdetud Trp jäägid asusid mõlemal väga hüdrofoobses keskkonnas, kuid *Tch. tepidum* antennis võisid need olla veel rohkem maetud (Lakowicz, 2006). Samas võib erinevuse põhjuseks olla ka ümbritsev erinev neeldumine, spektrite lisandi või hajumise erinev mahalahutamine või muu tehniline erisus, mille tõttu asümmeetriline lähendus võib nihkuda. Vastus sellele küsimusele võiks selguda järgnevatel korduskatsetel.



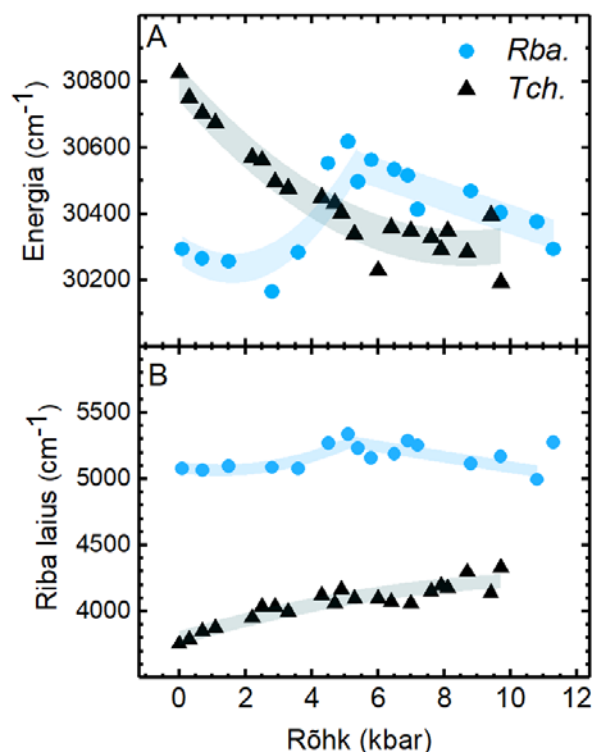
**Joonis 17.** Trüptofaani kiirgusribad *Rba. sphaeroides* ja *Tch. tepidum* LH2 kompleksides. Normaaltingimustel ( $\sim 0,001$  kbar;  $+23 \pm 0,5$  °C) ja 290-nm ergastusel mõõdetud spektrid on paremaks võrdluseks normeeritud. Spektri kuju analüüsist järeldatud riba maksimumid on:  $\lambda_{\text{max}} = 324 \pm 0,5$  nm (*Tch. tepidum*) ja  $\lambda_{\text{max}} = 330 \pm 0,5$  nm (*Rba. sphaeroides*).

### 5.2.2 Fluorestsentsispektrite rõhusõltuvus

Normeerimata kiirgusspektrite silmatorkavaim rõhu-häiritusest tingitud muutus on tugev Trp fluorestsentsi kustumine hüdrostaatilise rõhu tõustes (Joonis 18). Valgusisene Trp fluorestsents reeglina rõhu tõustes kustub (Arai ja Kuwajima, 1996; Jardetzky ja Lefèvre, 1998; Mune Mune jt., 2020), vaba Trp puhul tõuseb (Tris-HCl pH=7,5; kuni 6 kbar) (Ruan jt., 2000). Valgusisest Trp mitteradiatiivset relaksatsiooni põhjustab Trp liikumine kustutavate aminohappejääkide lähedusse või muu polaarsuse tõus. Peamine kustutaja võib käesolevas töös olla siiski hüdraatvesi (Luong jt., 2015; Roche jt., 2012; Roche ja Royer, 2018; Hata jt., 2020).



Joonis 18. *Rba. sphaeroides* (A) ja *Tch. tepidum* (B) LH2 komplekside trüptofaani fluorestsents kolmel valitud rõhul ja ergastusel 290 nm. Esitatud on normeerimata spektrid, millest on maha lahutatud vaid puhvri ning hajunud valguse foon. Spektreid on parema jälgitavuse huvides silutud Loessi regressiooni abil.



**Joonis 19.** Trüptofaani riba maksimumi (A) ja laiuse (B) võrdlus *Rba. sphaeroides* ● ning *Tch. tepidum* ▲ kiirgusspektrites. Y-telje määramatus  $\pm 0,5 \text{ nm}$  on energiaskaalas  $\pm 45 - 55 \text{ cm}^{-1}$  (graafikul sümbolite tagune värvitud ala) ja X-teljel  $\pm 0,02 \text{ kbar}$ . *Rba. sphaeroides* ultravioletse Trp maksimumi ja laiuse järsk muutus  $\sim 4 \text{ kbar}$  juures korreleerub Joonis 16 (lk 49) toodud pigmentide infrapuna mõõtmiste tulemustega.

Rõhu tõusul nihkus *Rba. sphaeroides* Trp maksimum kolme faasina,  $+0,5 \text{ nm}$  (1. punanihe),  $-3,5 \text{ nm}$  ( $\sim 4 \text{ kbar}$ , sininihe),  $+3 \text{ nm}$  (2. punanihe) (Joonis 19.A, sinine) ning seega katse viimaseks punktiks ( $11,3 \text{ kbar}$ ) oli taastunud maksimumi esialgne asukoht. Samas huvitav osa  $\lambda_{\text{max}}$  kõikumisest oli  $\sim 4 \text{ kbar}$  juures toimunud sininihe ( $\Delta\lambda = -3,5 \text{ nm}$ ;  $\Delta\nu = +300 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\sim 4 \text{ kbar}$ ). Sarnast sininihet sisaldavat Trp rõhusõltuvuse spektraalset mustrit on kirjanduses vähe, kõige sarnasemaks näiteks saab tuua uuringu, kus  $\sim 4 \text{ kbar}$  rõhul toimus  $\Delta\nu = +500 \text{ cm}^{-1}$  sininihe, mis samuti  $6,5 \text{ kbar}$  punktiks oli ka punanihkesse taastunud (Ruan jt., 1998), kuid muster tekkis maomürgi ensüümi spektris, mitte bakterite antennides. Töö autorid tõid välja, et rohkem sarnaseid tulemusi ei olnud publitseeritud. Bakteriaalsete LH2 antennide Trp eksperimentide osas peab samuti otsinguid jätkama.

Trp punanihke põhjuseks võib olla, et mittepolaarses keskkonnas on Trp ergastatud olek vähem stabiliseeritud - kui Trp polaarne kõrvalahel satub rõhu toimel polaarsemasse keskkonda, siis

lahusti kustutab Trp kiirgust ja seega madaldab energiat (Gasic, 2019) ja mis kutsub mitselli vesikeskkonna rõhu tõusul esile punanihe (Lotte jt., 2004).

Trp sininihke põhjuseks võib samuti olla kaudselt rõhu mõjul toimuv hüdraatvee valgu sisemusse imbumine, sest kõrge rõhu survele nõrgeneb hüdrofoobne efekt (Luong jt., 2015) ning see võib põhjustada Trp-BChl vahelise H-sideme katkemise, mis on tõestatud B850 spektrite põhjal (Kangur jt., 2008a). H-sideme katkemine võib muuta Trp vähem polaarseks, mis võib olla ajutise sininihke selgituseks.

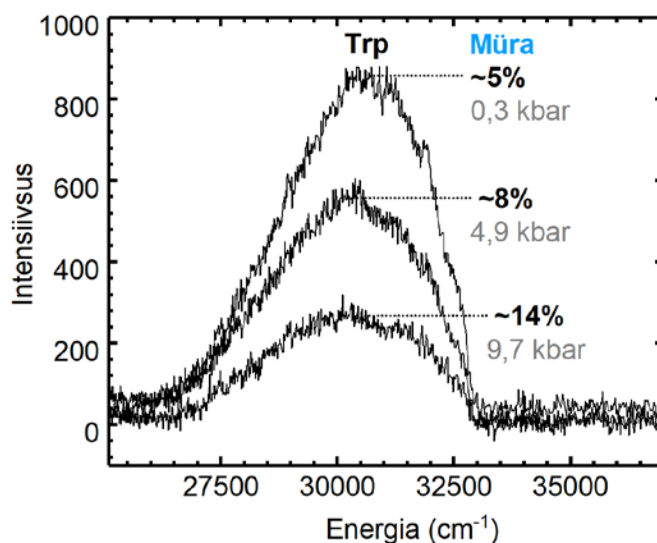
Rõhu mõjul hüdrofoobsete taskute hüdraatimist on tõestanud mitmed uuringud. Kui rõhk põhjustab valgu denaturatsiooni, siis Le Chatelier printsiibi kohaselt peab olema valgu ruumala ( $\Delta V$ ) muutunud väiksemaks, sest valgus paiknevatesse hüdraatimata taskutesse pääseb vesi, sealjuures kirjeldab ruumala muutus ka hüdrofoobsete taskute mahtu (Roche jt., 2012; Roche ja Royer, 2018). Samuti on leitud, et rõhu toimel valkude solvaatimise tõusu eksperimentaalseid tulemusi toetavad ka erinevad molekulaardünaamika simulatsiooni mudelid (Hata jt., 2020).

Käesolevas töös võrdlusena kasutatud *Tch. tepidum* Trp maksimumi nihe moodustas lihtsama rõhufunktsiooni (Joonis 19.A, must), lineaarse-sarnase 7 nm (0,7 nm/kbar) punanihke, mis leiti 21 erineva rõhupunkti andmeil (kuni 9,7 kbar). Lineaarsuse alusel võib järeldada, et toimub ühtlane Trp solvatsioon ja keskkonna polaarsuse tõus. Trp juhuslikud kõikumised suurematel rõhkudel tulenevad arvatavasti määramatusest, kuid selle ulatuse selgitamiseks on enne kordusanalüüsi tarvilik meetodika arenduse lisaanalüüsid, et leida viis signaali intensiivsuse tõstmiseks.

Kahe LH2 Trp riba laiuse rõhusõltuvus erines samuti, *Rba. sphaeroides* spektririba on kogu katse jooksul neljandiku võrra laiem, kui *Tch. tepidum* (Joonis 19.B). Siin on oluline teada, et ühe kiirgusriba taga on antennide kõik ~36-48 Trp jääki (Tabel 3, lk 85), seega illustratiivselt peegeldab spektririba kogu antenni Trp jääkide polaarsuse normaaljaotuse sarnast jaotust. Seega kui *Rba. sphaeroides* spekter laienes punasest ehk polaarsuse tõusule viitavast suunast, siis võib see viidata, et tema Trp asub polaarsemas/hüdrofiilsemas keskkonnas. Samas on ka võimalik, et *Tch. tepidum* riba laiusest on osa lihtsalt kustunud, kui näiteks hüdrofiilsema keskkonna Trp naabruskonnas asub kustutavaid jääke (Ghisaidoobe ja Chung, 2014). *Tch. tepidum* järjestustes leidub sagedamini paiknemist, kus Trp vahetus naabruses asuvad teada kustutajad (Tabel 2.B, lk 84), samas *Rba. sphaeroides* puhul sellist külgnemist ei ole. Tertsiaarse struktuuri interaktsioonide kirjeldamiseks jääb järjestustest väheks, ning vajalik oleks atomaarse lahutuvusega mudelite võrdlus, mille koostamine pole veel võimalikuks osutunud (RCSB Protein Data Bank).

### 5.2.3 Trüptofaani kiirgusspektrite mõõtemääramatus ja reprodutseeritavus

Kuna Trp riba on võrdlemisi lai, on selle maksimumi asukoha otse spektrilt määramine võrreldes pigmentide (B800, B850) neeldumisspektritega keerulisem ja suurenenud veavõimalusega, nagu on ka raporteeritud varem (Lotte jt., 2004). Seetõttu on Trp kiirguse analüüsi meetodika valikul suur tähtsus. Käesolevas töös kasutusel olnud meetodi, asümmeetrilise topeltsigmoidaalse lähenduse alusel simuleeritud spektririba analüüs, korratavus oli *Rba. sphaeroides* puhul maksimumi määramisel 99,8% ning riba laiuse määramisel 98,4% (erinevate sama inimese analüüsides ning eri analüüsijate tulemuste kattuvus). Seega varasemalt infrapuna analüüsiks välja töötatud meetodika oli ka Trp fluorestsentsi analüüsiks sobiv, kui veidi komplitseeritud Trp suure laiuse (seega ka laialivalguva maksimumi asukoha tõttu) ning suure signaal-müra suhte tõttu, mis kasvas rõhu suurenemisel tekkivast signaali kustumisest. Võrdluseks, BChl a infrapuna riba kõrguse ja mürafooni suhe jäi ka kõrgel rõhul alla 1% (0,5-0,9%, 0-10 kbar vahemikus), samas Trp ultravioletse kiirguse puhul moodustas mürafoon 5-14%, vastavalt 0,3-9,7 kbar rõhule (Joonis 20).



**Joonis 20.** Trüptofaani kiirguse spektri mürafooni osakaalu tõus rõhu suurenemisel kuni 9,7 kbar. Graafikul esitatud *Tch. tepidum*, mille LH2 oli küll rõhustabiilsem, kuid signaal oli poole madalam, kui *Rba. sphaeroides* mõõtmistel.

CCD anduri tundlikkusest tekkiv määramatus polnud oluliselt muutuv ega rõhust sõltuv, seega mürafooni osakaalu suurendab peamiselt Trp fluorestsentsi intensiivsuse rõhuseoseline kustumine.

Mürafooni amplituudi hindamiseks mõõdeti spektrid ilma ergastuse valgusallikata ning lahutati sellest automaatselt ka CCD anduri sisemine taustamüra.

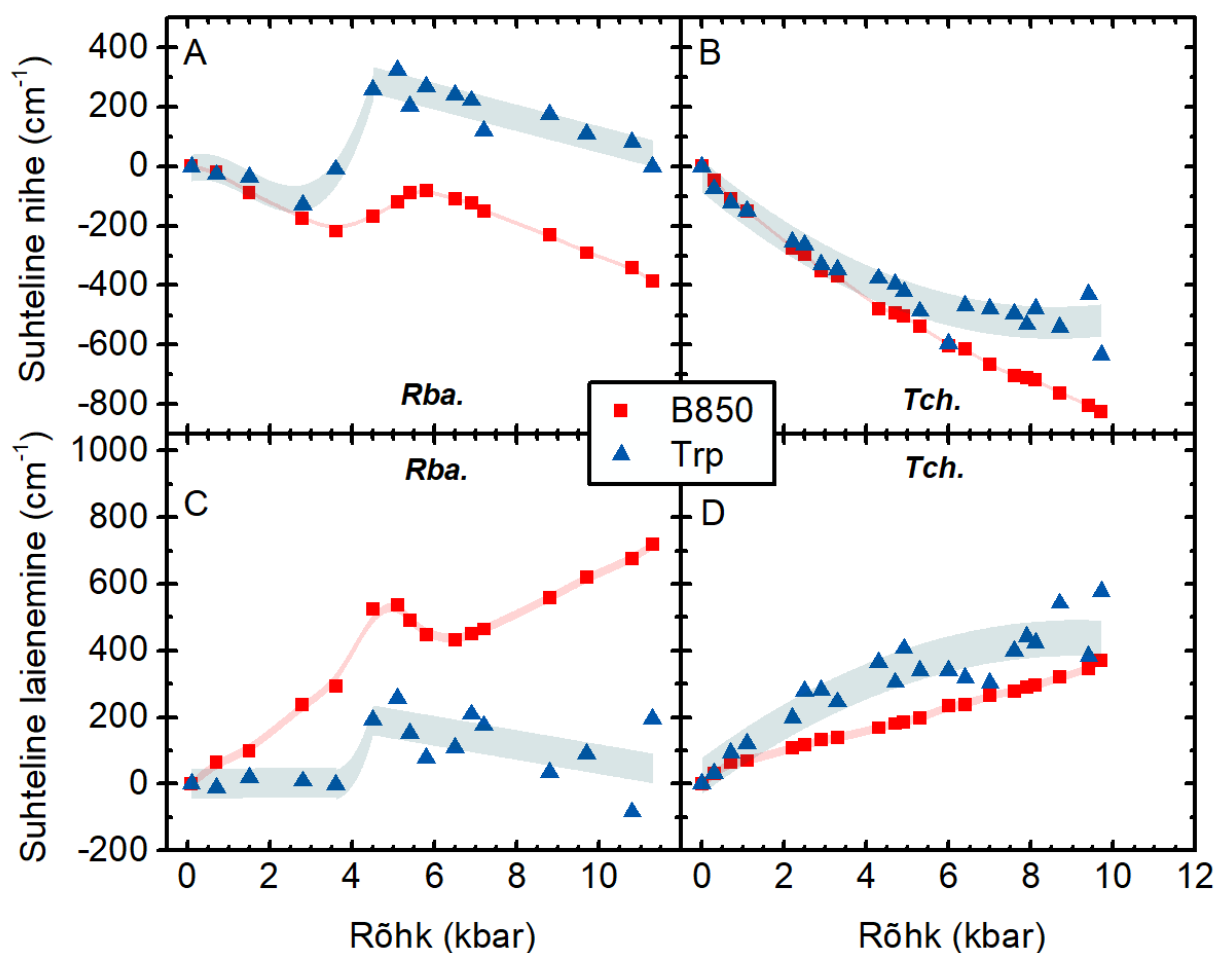
Arvestades Trp intensiivsuse kadumist rõhu-häirituse tõttu, tuli kasuks *Rba. sphaeroides* isoleeritud CrtC- LH2 eripära, et uuritav H-sideme katkemine toimub üsna madalal rõhul võrreldes sama organismi teiste proovimaterjalidega (isoleeritud CrtC- ~4-5 kbar; isoleeritud WT ~5 kbar; membraanist isoleerimata WT ~8 kbar) (Kangur jt., 2012). CrtC- mutandi LH2 destabiliseerituse tõttu oli võimalik uuringute kontekstis olulisi spektri muutusi jälgida madalamates rõhupunktides, kus fluorestsentsi intensiivsus on rohkem säilinud ning eristub mürafoonist tugevamalt. Eeltoodu on lisapõhjus, miks CrtC- mutant on H-sideme uuringute seisukohalt sobilikuks mudelorganismiks.



### 5.3 Trüptofaani kiirguse ja bakteriklorofüllü neeldumise rõhusõltuvuste võrdlus

Varasema teadmise kohaselt peegeldab *Rba. sphaeroides* B850 riba sininihe H-sidemete katkemist LH2 kompleksis (Kangur jt., 2008a) ja sininihke puudumine *Tch. tepidum* LH2 kompleksides nende kõrget termodünaamilist stabiilsust (Kangur jt., 2020). Sarnast loogikat järgides analüüsime järgnevalt ka Trp kiirguse rõhusõltuvusi, sest Trp on osa apoproteiinist, mis moodustab H-sideme B850 BChl a ligandidega (Fowler jt., 1994; Sturgis jt., 1997; Prince jt., 2003).

Kõikide töös mõõdetud spektrite parameetrite (riba maksimumi asukoht ja riba laius) rõhusõltuvused on toodud (Joonis 21). Parema võrreldavuse huvides on kasutatud suhtelist energiaskaalat, mis rõhutab parameetrite muutumist funktsioonina rõhust.



Joonis 21. B850 ■ neeldumise ja Trp ▲ kiirguse spektriribade suhteline nihe (A, B) ja suhteline laienemine (C, D) *Rba. sphaeroides* (A, C) ning *Tch. tepidum* (B, D) LH2 kompleksis sõltuvalt rõhust. Mõõtemääramatus ±0,5 nm, millele energiaskaalas vastab ±45-55 cm<sup>-1</sup> (graafikul sümbolite tagune toonitud ala) ja ±0,02 kbar.

Vaatamata vältimatule mürale, eristuvad kasutatud projektsioonis *Rba. sphaeroides* (Joonis 21.A ja C) ja *Tch. tepidum* (Joonis 21.B ja D) sõltuvused üksteisest mitte üksnes väga selgelt, vaid ka kvalitatiivselt. Kui *Tch. tepidum* puhul on sõltuvused laias laastus siledad (asukoht puna-nihkub ja laius kasvab ühtlaselt), siis *Rba. sphaeroides* puhul katkevad põhiolemuselt sarnased siledad sõltuvused järsult rõhkude vahemikus 3-5 kbar. Peale 5 kbar on sõltuvuse jälle enam-vähem siledad. Tähelepanu väärib ka see, et rõhkude vahemikus 3-5 kbar toimuvad parameetrite suhtelised muutused on üsna sarnased: suurusjärgus  $200-400 \text{ cm}^{-1}$ .

Trüptofaani ja B850 spektraalse käitumismustri kvalitatiivne sarnasus *Rba. sphaeroides* LH2 kompleksis viitab sellele, et spektraalseid iseärasusi tekitab miski, mis mõjutab üheaegselt nii kompleksi valgulist kui ka pigmentset osa. Varem on *Rba. sphaeroides* B850 riba näitel tõestatud, et vastavaid spektraalseid iseärasusi tekitab B850-Trp ja/või B850-Tyr vaheliste H-sidemete katkemine kõrge hüdrostaatilise rõhu toimel (Kangur jt., 2008a). Seega, nähes Joonis 21 graafikutel B850 ja Trp ribade korreleeritud käitumist, võib üsna üheselt järeldada, et H-sidemete katkemisega kaasneb valgu konformatsiooniline muutus.

Keerulisem on mõista ja seletada, mis täpselt LH2 pigment-valgu kompleksis välise hüdrostaatilise rõhu kasvades toimub. Tavapäraselt (Lacowicz, 2006) seostatakse Trp fluorestsentsi punanihet tema vahetu keskkonna polaarsuse suurenemisega, sininihet aga vastavalt selle vähenemisega. Trüptofaani fluorestsentsi nihet mitmesugustes globulaarsetes valkudes on kirjanduses selgitatud nii H-sideme katkemisest tingitud polaarsuse muutusega (Hager ja Wallace, 1984; Koenig jt., 2001; Ghisaidoobe ja Chung, 2014) kui ka rõhu toimel hüdraatvee hüdrofoobsetesse taskutesse tungimisega (Cioni ja Gabellieri, 2010; Luong jt., 2015; Roche ja Royer, 2018) või mõlemaga korraga.

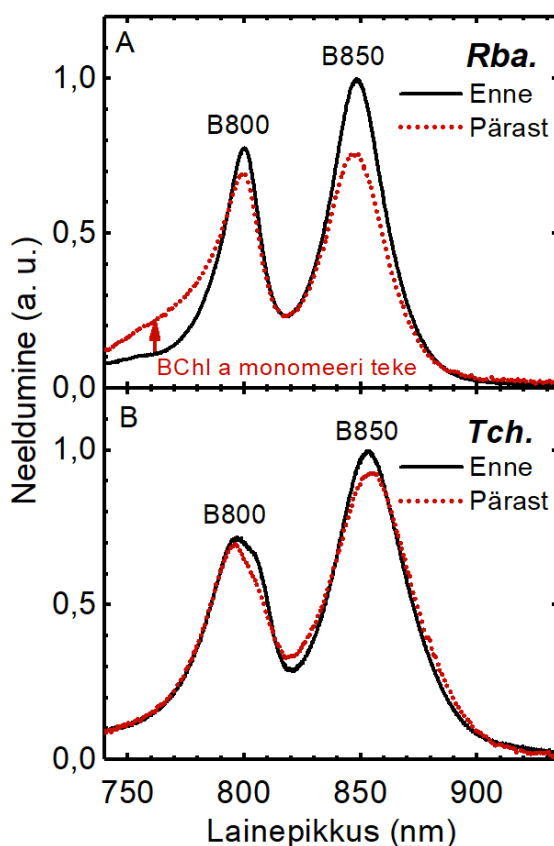
Me oletame, lähtudes klassikalisest tõlgendusest, et *Rba. sphaeroides* ja *Tch. tepidum* LH2 komplekside jaoks üldine Trp punanihe toimub vastavate valkude solvatsiooni tõttu, sh hüdrofoobsete taskute veestamine (Ruan jt., 1998), mis rõhuga tasapisi süveneb. *Rba. sphaeroides* 3-5 kbar rõhul toimuva järsu sininihke, millega kaasneb spektri oluline laienemine, selgituseks võib siis olla Trp ja BChl vaheliste H-sidemete katkemine, mitte Trp ajutine (sest punanihe jätkub peale 5 kbar) mittepolaarsesse keskkonda sattumine. Vesiniksideme katkemine mõjutab Trp elektronstruktuuri, mistõttu loomulikult modifitseeruvad ka elektronide üleminekuenergiad. Sarnase mehhanismiga selgitati varem ka B850 eksitonide spektris jälgitud

rõhu poolt indutseeritud spektraalseid muutusi (Kangur jt., 2008a) (vt ka Fowler, 1994; Freiberg jt., 2010; Kangur jt., 2012; Pajusalu jt., 2019). Kuigi B850 ja Trp optiliste markerite füüsikaline olemus on suuresti erinev (üks on seotud BChl a kollektiivsete eksitatsiooniretega, teine Trp lokaalsete elektronüleminekutega), siis nende ~4 kbar rõhul jälgitavate sininihete põhjus on põhimõtteliselt sarnane. Täiendavad uuringud on kutsutud seda esialgset mehhanistlikku tõlgendust kas täiendama-kinnitama või ümber lükkama.

## 5.4 Objektide stabiilsus ja taastumine pärast rõhutsüklit

### 5.4.1 Lähi-infrapuna spektrid

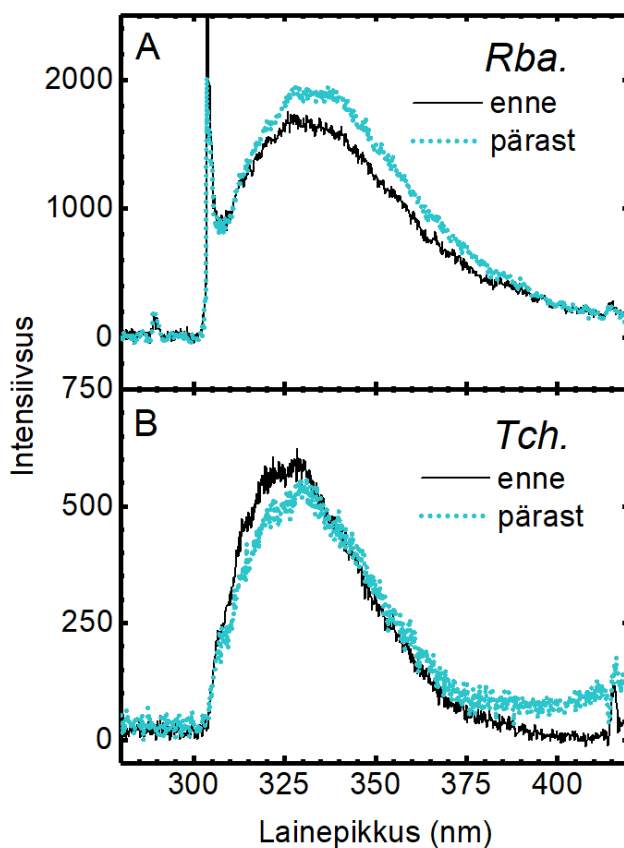
Uuritavate proovide signaali kahanemise põhjus ei ole alati täpselt teada. Lisaks eelnevates peatükkides kirjeldatud kustutamisele võivad esineda ka eksperimentaalsed tehnilised põhjused, nagu näiteks rõhuraku leke või valkkompleksi lagunemine, mis võib juhtuda ka suure stabiilsusega objektidel. Lagunemisega kaasneb hea õnne korral uue energiaoleku ilmumine spektrisse, näiteks kui B850 oligomeer laguneb rõhu või temperatuuri mõjul (Ma jt., 2009) BChl monomeerideks, siis B850 kahanemisel kerkib uus ~770 nm riba (Joonis 22.A) (Feick ja Drews, 1978). *Tch. tepidum* LH2 on taastunud suuremal määral, kuid ebaproportsionaalselt. Teadmata põhjusel on osa B850 signaalist kaduma läinud, aga laguproduktide ribasid ei kerkinud (Joonis 22.B). Üldiselt oli monomeerideks lagunemine erandlik fenomen ning selle tagamaad vajavad edasist selgitamist.



**Joonis 22. IR spektrite taastumine pärast rõhutsüklit. Paneelil (A) ilmnev õlg vahemikus 750-800 nm on teadaolevalt tingitud solubiliseeritud BChl a monomeeridest, mis kinnitab osa LH2 komplekside lagunemist. Lagunemise üheks põhjuseks võib olla rõhu järsust langetamisest tingitud hüdrauliline löök. (B) Teadmata tüüpi B850 lagunemine.**

### 5.4.2 Ultravioletsed spektrid

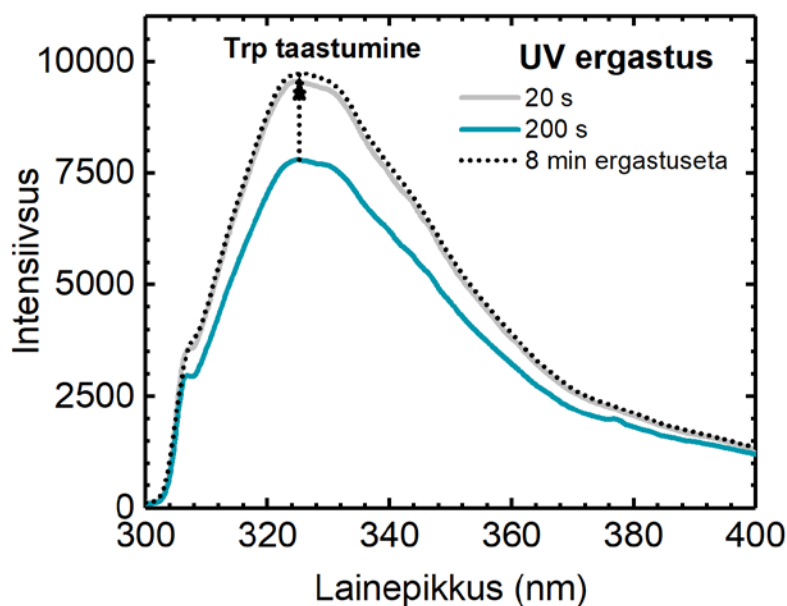
Üks fluorofooride uurimise probleeme on fotoooksüdatsioon ning -degradatsioon (Ghisaidoobe ja Chung, 2014), seda eriti kromofooridel nagu trüptofaan, mis neelavad ainult UV-kiirgust. Hindamaks ergastuslaseri mõju uurimisobjektide spektritele, analüüsiti objekti stabiilsust UV-kiirguse suhtes ning UV/rõhutsükli suhtes. Trp spektrid enne ja pärast UV-kiirguse/rõhu tsüklit (Joonis 23), näitasid, et *Tch. tepidum* spekter on taastunud suuremal määral ning *Rba. sphaeroides* spektril on rõhutsükli jooksul toimunud kiirgusriba laienemine punasemasse alasse. Trp riba laienemine viitab antud kontekstis sellele, et tsükli järgselt on veega kokkupuutes Trp arv tõusnud. Mis mehhanism antud muutust täpsemalt põhjustas, vajab edasist uurimist.



**Joonis 23. Trüptofaani fluorestsentsi taastumine pärast rõhutsüklit: *Rba. sphaeroides* (A) ja *Tch. tepidum* (B). Paneelil (A) nähtav piik on spektrite töötlemise artefakt.**

Proovimaterjali stabiilsust UV-kiirguse suhtes mõõdeti LH2 lahuse spektrid rõhurakus madalaimal rõhul, kümne 20-sekundilise 100mW 290 nm UV-kiirguse doosina, misjärel tehti 8-minutine paus

ning mõõdeti Trp taastumine (Joonis 24). Leiti, et Trp on antud metoodika puhul võrdlemisi vähe UV-kiirgusest kahjustatud, kui kasutatakse võimalikult lühidat 290 nm ergastust (20 sek), madalat laseri võimsust (40 mW) ning iga Trp spektri mõõtmise vahele jääb ~10 min paus, mille jooksul mõõdetakse teisi spektreid ning tänu millele saab Trp signaal taastuda. Sel juhul on kogu tsükli jooksul toimuv signaali kustumine UV kahjustuse tõttu väike, mida kinnitab ka spektri taastumine.



**Joonis 24.** Trüptofaani kiirguse kustumine püsival rõhul (~100 bar) toimuva kiirituse käigus ja selle taastumine kiiritustsükli järgnenud 8-minutilise pausi järgselt. Objekti kiiritati 290 nm lainepikkusega ja 100 mW võimsusega laseriga 20 sek kestvate järjestikuste seansside kaupa.

Membraanist isoleeritud *Rba. sphaeroides* CrtC- LH2 ning *Tch. tepidum* WT LH2 antennkompleksid olid antud töös toodud tingimustel mõõtmiste sooritamiseks piisavalt stabiilsed, et ka 290 nm UV laserergastuse ning väga kõrge hüdrostaatilise rõhu toimel kuni ~10 kbar mõjul reeglina siiski ei toimunud uurimisobjekti lagunemist ja seetõttu võib öelda, et tegemist on rõhu suhtes stabiilsete uurimisobjektidega. Proovimaterjali sobivust uuringuteks on kinnitanud ka teised sarnased eksperimendid (Pajusalu jt., 2019; Kangur jt., 2020).

## 5.5 Katselise töö tulemused ja edasiste uuringute perspektiivid

Vastavuses peatükis 3 formuleeritud eesmärkidega

1. Arendati välja unikaalne meetodika neeldumis- ja kiirgusspektite üheaegseks (ja/või paralleelseks) mõõtmiseks laias UV - IR spektri vahemikus, koos kõrgete rõhkude (kuni 20 kbar) rakendamise võimalusega.
2. Analüüsiti Trp kui optilise markeri sobivust fotosünteesiliste membraanvalkude välisest rõhust tingitud denatureerimise uurimiseks. Isoleeritud LH2 komplekside näitel leiti kiiritustingimused, mis võimaldavad Trp rahuldavat kasutamist optilise markerina. UV-valgusega kiiritamine on suhteliselt ohutu (objekt püsib stabiilne ja tema spektrid taastuvad), kui kasutada 40 mW võimsusega 290 nm valgust 20 s jooksul. Kiiritust võib korrata pärast umbes 10-min pime-pausi.
3. Töö peamise hüpoteesi testimiseks võrreldi *Rba. sphaeroides* CrtC- mutandi LH2 kompleksi B850 bakterklorofülle iseloomustava neeldumisriba ja valkumaatriksi koostisse kuuluva Trp kiirgusriba käitumist kõrge rõhu all. Negatiivse kontrollina kasutati tugeva ehitusega termofiilset *Tch. tepidum* LH2 kompleksi, milles teadaolevalt rõhu toimel tertsiaalsed H-sidemed ei katke. Katsed *Rba. sphaeroides* kompleksiga näitasid iseloomulikke ebaregulaarsusi nii B850 neeldumisriba kui Trp kiirgusriba käitumises, mis avaldusid praktiliselt ühel ja samal rõhul ~4 kbar (Joonis 21, lk 57). Täiesti erinevalt käitusid *Tch. tepidum* kompleksid, mille spektrites sarnaseid ebaregulaarsusi ei esinenud (Joonis 21, lk 57).

Kokkuvõttes leidsid kvalitatiivset kinnitust kõik meie töös püstitatud hüpoteesid. H-sidemete rõhu all katkemise füüsikalise mudeli ehitamiseks ja sellest kvantitatiivsete järelduste tegemiseks peaks aga oluliselt parandama eelkõige UV-mõõtmiste kvaliteeti.

Kuigi see on edasiste uuringute teema, saab neid eesseisvaid tegevusi juba täna üldjoontes kaardistada. Spektroskoopiliste mõõtmiste kvaliteet sõltub esmajoones signaali (antud juhul fluorestsentsi) ja müra intensiivsuste suhtest. Suhe kasvab nii signaali suurenedes kui ka müra vähenedes. Müra ise sõltub lõppkokkuvõttes samuti signaalist, vähenedes (teatud müra statistika puhul) proportsionaalselt  $\sqrt{N}$ , kus  $N$  on registreeritud footonite arv. Signaali suurendamiseks on mitmeid võimalusi. Kõige lihtsam on suurendada ergastava laseri võimsust. Nagu käesolevas töös nägime (vt tulemuste teine punkt), on sellel kahjuks objekti stabiilsusega seatud piirid. Suurem

võimsus kahjustab pöördumatult valgulist uurimisobjekti. Sama juhtub, kui lihtsalt mõõtmisaega pikendada. Üle jääb vaid kallis ning aeganõudev mõõtmisseadme täiustamine, kasutades veelgi suurema valgusjõuga spektrograafe, tundlikumaid detektoreid, optimeeritud optilisi sõlmi ja elemente jne. Lõpuks võib eesmärgi saavutamiseks kasutada täiesti erinevat lähenemist. Nimelt katsetada teisi, sh geneetiliselt modifitseeritud, objekte.



## 6 Kokkuvõte

Magistritöös uuriti purpurbakterite valgust koguvate antennkomplekside apoproteiini ja bakterklorofüll a ligandi vaheliste tertsiaarsete vesiniksidemete katkemist rõhu-häirituse meetodil.

Katselise töö idee põhines teadaoleval asjaolul, et membraanvalkudes eelistavad aromaatsed aminohappejäägid, sh trüptofaan, koonduda valgu ja teda ümbritseva vesilahuse piirpinnale. Trüptofaani fluorestsents on äärmiselt tundlik keskkonna polaarsuse suhtes, võimaldades uurida apoproteiini reaktsiooni väliselt rakendatud rõhule.

Uurimisobjektiks oli purpurbakteri *Rhodobakter sphaeroides* fotosünteetilisest membraanist isoleeritud perifeerne valgust koguv antennikompleks LH2, mille rõhu-resistentsust oli võrreldes metsiktüvelise kompleksiga geenitehnoloogiliselt madaldatud. Tulemusi võrreldi termofiilse metsiktüvelise bakteri *Thermochromatium tepidum* LH2 antenni mõõtmise andmetega.

Töö metoodilises osas uuriti trüptofaani fluorestsentsi kui optilise markeri sobivust raporteerimaks LH2 valgu hüdrostaatilisel kokkusurumisel toimuvatest konformatsioonilistest muutustest ja määrati tehnilised tingimused (sh lubatud kiirituse intensiivsus ja doos ergastaval lainepikkusel), mille järgimisel on mõõtmistulemused usaldatavad. Töö sisulises osas uuriti üheaegselt antenni neeldumis- ja kiirgusspektreid rõhu all kuni 11 kbar (1,1 GPa) laias UV-IR spektri vahemikus. Lai vahemik oli vajalik, katmaks nii apoproteiini käitumist iseloomustavat trüptofaani kiirgust kui ka bakterklorofüll a ligandidele iseloomulikku kollektiivset B850 neeldumist. Mõlema spektri rõhusõltuvuses avastati riba asukohta ja laiuse ebaregulaarsused, mis avaldusid praktiliselt ühel ja samal rõhul ~4 kbar. Varasematele andmetele toetudes kinnitab see antud töö põhihüpoteesi, et LH2 tertsiaarsete vesiniksidemete katkemine kõrge rõhu toimel on tõenäoliselt seotud hüdraatvee sisse imbumisega valgu hüdrofoobsesse keskkonda, kus polaarsed vee molekulid võistlevad edukalt bakterklorofüll a molekulidega vesiniksidemete ligandi rolli pärast.

Fototroofide uuringute üheks järjekindlamaks praktiliseks väljundiks viimastel aastakümnetel on Päiksekütuse bioreaktorid (Luo jt., 2017) ning kolmanda generatsiooni Päiksepaneelid, mis küll löövad eelmisi tehnoloogiaid ökonoomsusega ning hämaruses töötamisega, kuid mille stabiilsus on veel probleemiks (Ravi jt., 2019; Maddah jt., 2020).

# **Intrinsic optical markers in high hydrostatic pressure perturbation research of photosynthetic chromoproteins**

Silja Erg

## **Summary**

Stability and energy landscapes of proteins is a rising topic in research. It is clear by now that protein folding and stability is strongly affected by hydrogen bonding, but the mechanisms guiding these interaction networks remain a question (Roche and Royer, 2018; Deinum *et al.*, 1991; Moulisova *et al.*, 2009; L  er *et al.*, 2015; Niedzwiedzki *et al.*, 2018; Kangur *et al.*, 2020).

The aim of this research was to study the mechanism behind pressure induced protein-ligand hydrogen bond rupture and to develop a novel method for parallel measurement of ligand infrared and intrinsic protein ultraviolet markers. Method for conducting the research was barospectroscopy – the protein sample was placed between two diamonds in a diamond anvil cell (DAC) and pressure was applied gradually to induce tertiary hydrogen bond rupture, following the pressure release and recovery of bonds. Changes were monitored using ultraviolet-infrared spectroscopy.

The test subject was a widely used pigment-protein model complex named LH2 (light harvesting antenna 2). Two samples were researched, destabilized ligand pigment mutant CrtC- *Rhodobacter sphaeroides* (bond rupture model) and wild type thermophilic *Thermochromatium tepidum* (thermodynamically stable negative control for bond rupture).

The main result was found to be the correlating irregularities in both ligand and intrinsic protein markers, a detected blue shift induced by ~4 kbar pressure, which was interpreted at this time as hydrogen bond rupture caused by hydration of hydrophobic pockets of the LH2 complex. During the research it was found that tryptophan fluorescence can be successfully used as an optical marker in the pressure perturbations at least up to 11 kbar (1,1 GPa). It was also found that to prevent tryptophan signal loss and complex degradation in the high stress ultraviolet radiation and pressure cycle, 40 mW 290 nm UV-laser can be used, but 8-10 min recovery breaks are needed. The method remains in development.

Phototrophic bacteria research has been applied in bioreactor technologies (Luo *et al.*, 2017). A growing number of third generation DSSC Solar cells are created using bacterial light harvesting macromolecules, but the stability of the devices is still an issue (Ravi *et al.*, 2019; Maddah *et al.*, 2020). Plant based photosynthetic pigments like  $\beta$ -carotene are widely used to quench radicals in tissues, but lately have been proven to cause pro-oxidant pathways which raise cancer risk for heavy smokers (Boehm *et al.*, 2020). The latter shows how fundamental knowledge about pigment-protein quantum physics could also be applied interdisciplinarily in medicine and possibly in other fields, not only in Solar energetics.

## **7 Tänuavaldused**

Soovin tänada antud töö juhendajaid dr Kõu Timpmann, dr Liina Kangur ja professor Arvi Freiberg, kes olid nõus mind enda töörühma õppima võtma ning esimesest päevast peale kasulikke materjale ning tehnilisi juhiseid andma, ning jätkasid sama produktiivset tööd kogu kahe aasta jooksul. Pidevalt teadustööde viidetes oma juhendajate nimede leidmine tekitas muidugi aukartust, aga sellegipoolest oli tegemist väga rahuliku, tore ja kahe jalaga maa peal oleva seltskonnaga, kes on tõsiselt biofüüsikale ja teadusliku metoodika õpetamisele pühendunud.

Proovimaterjali laenamise eest olgu tänatud Sheffieldi Ülikooli C. N. Hunteri töörühm Suurbritannias ning Jaapani Ibaraki Ülikooli Z.-Y. Wang-Otomo rühm.

Samuti sooviksin tänada TUMRI õppekorralduse spetsialisti Janika Vana ja programmijuhti Margus Leppikut, kes päästsid mind bürokraatia eest mõnel ettetulnud kriitilisel momendil.

Erilise tänu on teeninud ka pere ja sõbrad ning kursusekaaslased, kes elasid tööle kaasa, millel oli väga positiivne mõju keskendumisele.

## 8 Kasutatud kirjandus

### Artiklid ja raamatud

1. Adolphs, J. ja Renger, T. (2006). How proteins trigger excitation energy transfer in the FMO complex of green sulfur bacteria. *Biophysical Journal* 91(8): 2778-2797.
2. Allen, M. W. (2009). Wavelength accuracy–measurement and effect on performance in UV-Visible spectrophotometry. *Thermo Technical Note*: 51171.
3. Anzellini, S., Dewaele, A., Mezouar, M., Loubeyre, P. ja Morard, G. (2013). Melting of iron at Earth's inner core boundary based on fast X-ray diffraction. *Science* 340(6131): 464-466.
4. Arai, M. ja Kuwajima, K. (1996). Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of alpha-lactalbumin. *Folding and Design* 1(4): 275-287.
5. Atkins, P. ja de Paula, J. (2006). *Physical Chemistry, 8th Edition*. UK: Oxford University Press.
6. Baker, P.L., Orf, G.S., Kevershan, K., Pyne, M.E., Bicer, T. ja Redding, K.E. (2019). Using the endogenous CRISPR-Cas system of *Heliobacterium modesticaldum* to delete the photochemical reaction center core subunit gene. *Applied and Environmental Microbiology* 85(23): e01644-19.
7. Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta* 1767(9): 1073-1101.
8. Boehm, F., Edge, R. ja Truscott, T.G. (2020). Anti-and pro-oxidative mechanisms comparing the macular carotenoids zeaxanthin and lutein with other dietary carotenoids—a singlet oxygen, free-radical in vitro and ex vivo study. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 10.1039/D0PP00120A.
9. Bridgman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by pressure *Journal of Biological Chemistry* 19: 511-512.
10. Brixner, T., Stenger, J., Vaswani, H.M., Cho, M., Blankenship, R.E. and Fleming, G.R. (2005). Two-dimensional spectroscopy of electronic couplings in photosynthesis. *Nature* 434(7033): 625-628.
11. Brotosudarmo, T. H., Kunz, R., Bohm, P., Gardiner, A. T., Moulisova, V., Cogdell, R. J. ja Köhler, J. (2009). Single-molecule spectroscopy reveals that individual low-light LH2 complexes from *Rhodopseudomonas palustris* 2.1.6. have a heterogeneous polypeptide composition. *Biophysical Journal* 97(5): 1491-1500.

12. Brunisholz, R. A. ja Zuber, H. (1992). Structure, function and organization of antenna polypeptides and antenna complexes from the three families of *Rhodospirillaneae*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 15(1-2): 113-140.
13. Cao, J., Cogdell, R. J., Coker, D. F., Duan, H. G., Hauer, J., Kleinekathofer, U., Jansen, T. L. C., Mancal, T., Miller, R. J. D., Ogilvie, J. P., Prokhorenko, V. I., Renger, T., Tan, H. S., Tempelaar, R., Thorwart, M., Thyraug, E., Westenhoff, S. ja Zigmantas, D. (2020). Quantum biology revisited. *Science advances* 6(14): eaaz4888.
14. Carella, A., Borbone, F. ja Centore, R. (2018). Research progress on photosensitizers for DSSC. *Frontiers in chemistry* 6: 481.
15. Chandrasekaran, S. (2019). Excitonic-vibronic coupling in natural and artificial light-harvesting systems. *Advances in Spectroscopy: Molecules to Materials*. 111-123. Singapore: Springer.
16. Chervin, J. C., Power, C. ja Polian, A. (2005). Quartz as a pressure sensor in the infrared. *High Pressure Research* 25(2): 97-105.
17. Chi, S.C., Mothersole, D.J., Dilbeck, P., Niedzwiedzki, D.M., Zhang, H., Qian, P., Vasilev, C., Grayson, K.J., Jackson, P.J., Martin, E.C. ja Li, Y. (2015). Assembly of functional photosystem complexes in *Rhodobacter sphaeroides* incorporating carotenoids from the spirilloxanthin pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1847(2): 189-201.
18. Cioni, P. ja Gabellieri, E. (2011). Protein dynamics and pressure: what can high pressure tell us about protein structural flexibility? *Biochimica et Biophysica Acta* 1814(8): 934-941.
19. Cogdell, R. J., Gall, A. ja Köhler, J. (2006). The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* 39(3): 227-324.
20. Cogdell, R. J., Howard, T. D., Bittl, R., Schlodder, E., Geisenheimer, I. ja Lubitz, W. (2000). How carotenoids protect bacterial photosynthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355(1402): 1345-1349.
21. Cogdell, R.J. ja Thornber, J.P. (1980). Light-harvesting pigment—protein complexes of purple photosynthetic bacteria. *FEBS Letters* 122(1): 1-8.
22. Coomber, S.A., Chaudhri, M., Connor, A., Britton, G. ja Hunter, C.N. (1990). Localized transposon Tn5 mutagenesis of the photosynthetic gene cluster of *Rhodobacter sphaeroides*. *Molecular Microbiology* 4(6): 977-989.

23. Croce, R., van Grondelle, R., van Amerongen, H. ja van Stokkum, I. (2018). *Light Harvesting in Photosynthesis*. 1. Boca Raton: CRC Press.
24. Daniel, I., Oger, P. ja Winter, R. (2006). Origins of life and biochemistry under high-pressure conditions. *Chemical Society Reviews* 35(10): 858-875.
25. de la Lande, A., Moliner, V. ja Salahub, D. (2015). Measurement and prediction of quantum coherence effects in biological processes. *Physical Chemistry Chemical Physics* 17(46): 30772-30774.
26. Deinum, G., Otte, S. C., Gardiner, A. T., Aartsma, T. J., Cogdell, R. J. ja Ames, J. (1991). Antenna organization of *Rhodospseudomonas acidophila*: a study of the excitation migration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1060(1): 125-131.
27. Demmig-Adams, B., Garab, G., Adams III, W. ja Govindjee (2014). *Non-photochemical quenching and energy dissipation in plants, algae and cyanobacteria*. vol. 40. Dordrecht: Springer Netherlands.
28. Dewaele, A., Loubeyre, P., Occelli, F., Marie, O. ja Mezouar, M. (2018). Toroidal diamond anvil cell for detailed measurements under extreme static pressures. *Nature communications* 9(1): 2913.
29. Dong, Z. ja Song, Y. (2011). Novel pressure-induced structural transformations of inorganic nanowires. *Nanowires-Fundamental Research*. IntechOpen.
30. Dubrovinskaja, N., Dubrovinsky, L., Solopova, N. A., Abakumov, A., Turner, S., Hanfland, M., Bykova, E., Bykov, M., Prescher, C., Prakapenka, V. B. ja Petitgirard, S. (2016). Terapascal static pressure generation with ultrahigh yield strength nanodiamond. *Science advances* 2(7): 1600341.
31. Eftink, M. R. (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophysical Journal* 66(2): 482-501.
32. Engel, G.S., Calhoun, T.R., Read, E.L., Ahn, T.K., Mančal, T., Cheng, Y.C., Blankenship, R.E. and Fleming, G.R. (2007). Evidence for wavelike energy transfer through quantum coherence in photosynthetic systems. *Nature* 446(7137): 782-786.
33. Feick, R. ja Drews, G. (1978). Isolation and characterization of light harvesting bacteriochlorophyll-protein complexes from *Rhodospseudomonas capsulata*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 501(3): 499-513.

34. Flanagan, M.L., Long, P.D., Dahlberg, P.D., Rolczynski, B.S., Massey, S.C. ja Engel, G.S. (2016). Mutations to *R. sphaeroides* reaction center perturb energy levels and vibronic coupling but not observed energy transfer rates. *The Journal of Physical Chemistry A*, 120(9): 1479-1487.
35. Fowler, G. J. S., Sockalingum, G. D., Robert, B. ja Hunter, C. N. (1994). Blue shifts in bacteriochlorophyll absorbance correlate with changed hydrogen bonding patterns in light-harvesting 2 mutants of *Rhodobacter sphaeroides* with alterations at  $\alpha$ -Tyr-44 and  $\alpha$ -Tyr-45. *Biochemical Journal* 299(3): 695-700.
36. Fowler, G. J., Gardiner, A. T., Mackenzie, R. C., Barratt, S. J., Simmons, A. E., Westerhuis, W. H., Cogdell, R. J. ja Hunter, C. N. (1995). Heterologous expression of genes encoding bacterial light-harvesting complexes in *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Biological Chemistry* 270(40): 23875-23882.
37. Frank, H. A. ja Cogdell, R. J. (1996). Carotenoids in photosynthesis. *Photochemistry and photobiology* 63(3): 257-264.
38. Frauenfelder, H. (1984). From atoms to biomolecules. *Helvetica Physica Acta* 57(2): 165-187.
39. Freiberg, A., Kangur, L., Olsen, J. D. ja Hunter, C. N. (2012). Structural implications of hydrogen-bond energetics in membrane proteins revealed by high-pressure spectroscopy. *Biophysical Journal* 103(11): 2352-2360.
40. Freiberg, A., Pajusalu, M. ja Rätsep, M. (2013). Excitons in intact cells of photosynthetic bacteria. *The Journal of Physical Chemistry B* 117(38): 11007-11014.
41. Freiberg, A., Timpmann, K. ja Trinkunas, G. (2010). Spectral fine-tuning in excitonically coupled cyclic photosynthetic antennas. *Chemical Physics Letters* 500(1-3): 111-115.
42. Friedrich, J. (1995). Hole burning spectroscopy and physics of proteins. *Methods in Enzymology* 246: 226-259.
43. Frischmann, P. D., Mahata, K. ja Wurthner, F. (2013). Powering the future of molecular artificial photosynthesis with light-harvesting metallosupramolecular dye assemblies. *Chemical Society Reviews* 42(4): 1847-1870.
44. Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz. *Annalen der physik* 437(1-2): 55-75.
45. Gabrielsen, M., Gardiner, A. T. ja Cogdell, R. J. (2009). *Peripheral complexes of purple bacteria*. 135-153. Dordrecht: Springer.



46. Gall, A., Ellervee, A., Sturgis, J. N., Fraser, N. J., Cogdell, R. J., Freiberg, A. ja Robert, B. (2003). Membrane protein stability: high pressure effects on the structure and chromophore-binding properties of the light-harvesting complex LH2. *Biochemistry* 42(44): 13019-13026.
47. Garavito, R. M. ja Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as tools in membrane biochemistry. *Journal of Biological Chemistry* 276(35): 32403-32406.
48. Gasic, A. G., Boob, M. M., Prigozhin, M. B., Homouz, D., Daugherty, C. M., Gruebele, M. ja Cheung, M. S. (2019). Critical phenomena in the temperature-pressure-crowding phase diagram of a protein. *Physical Review X* 9(4).
49. Gellings, E., Cogdell, R.J. ja van Hulst, N.F. (2020). Room-Temperature Excitation–Emission Spectra of Single LH2 Complexes Show Remarkably Little Variation. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 11(7): 2430-2435.
50. Ghisaidoobe, A. B. ja Chung, S. J. (2014). Intrinsic tryptophan fluorescence in the detection and analysis of proteins: a focus on Förster resonance energy transfer techniques. *International Journal of Molecular Science* 15(12): 22518-22538.
51. Goehlich, A., Kawetcki, T. ja Döbele, H. F. (1998). On absolute calibration with xenon of laser diagnostic methods based on two-photon absorption. *Journal of Chemical Physics* 108(22): 9362-9370.
52. Golub, M., Pieper, J., Peters, J., Kangur, L., Martin, E.C., Hunter, C.N. ja Freiberg, A. (2019). Picosecond dynamical response to a pressure-induced break of the tertiary structure hydrogen bonds in a membrane chromoprotein. *The Journal of Physical Chemistry B* 123(9): 2087-2093.
53. Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. ja Singh, R. M. (1966). Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5(2): 467-477.
54. Grasset, O. (2001). Calibration of the R ruby fluorescence lines in the pressure range [0-1 GPa] and the temperature range [250-300 K]. *High Pressure Research* 21(3-4): 139-157.
55. Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W. ja Scheer, H. (2006). Chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Netherlands: Springer
56. Hager, J. ja Wallace, S.C. (1984). Supersonic beam studies of hydrogen-bonded indoles: relative interaction strengths. *The Journal of Physical Chemistry* 88(23): 5513-5519.

57. Harel, E. ja Engel, G. S. (2012). Quantum coherence spectroscopy reveals complex dynamics in bacterial light-harvesting complex 2 (LH2). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(3): 706-711.
58. Hata, H., Nishiyama, M. ja Kitao, A. (2020). Molecular dynamics simulation of proteins under high pressure: structure, function and thermodynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1864(2): 129395.
59. Hunter, C.N., Daldal, F., Thurnauer, M.C. ja Beatty, J.T. (2008). *The Purple Phototrophic Bacteria* (Vol. 28). Springer: Dordrecht
60. Imhoff, J. F. (2006). The Family *Ectothiorhodospiraceae*. *The Prokaryotes*. 874-886. New York: Springer.
61. Imhoff, J. F. (2017). Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. *Modern Topics in the Phototrophic Prokaryotes*. 427-480.
62. Ishizaki, A. ja Fleming, G. R. (2009). Unified treatment of quantum coherent and incoherent hopping dynamics in electronic energy transfer: reduced hierarchy equation approach. *The Journal of Chemical Physics* 130(23): 234111.
63. Jalviste, E., Timpmann, K., Chenchiliyan, M., Kangur, L., Jones, M.R. ja Freiberg, A. (2020). High-Pressure Modulation of Primary Photosynthetic Reactions. *The Journal of Physical Chemistry B* 124(5): 718-726.
64. Jamieson, J. C., Lawson, A. W. ja Nachtrieb, N. D. (1959). New device for obtaining X-ray diffraction patterns from substances exposed to high pressure. *Review of Scientific Instruments* 30(11): 1016-1019.
65. Jankowiak, R., Hayes, J. M. ja Small, G. J. (1993). Spectral hole-burning spectroscopy in amorphous molecular solids and proteins. *Chemical Reviews* 93(4): 1471-1502.
66. Jardetzky, O. ja Lefèvre, J. F. (1998). *Protein dynamics, function, and design* 1, vol. 301. USA: Springer.
67. Jinkerson, R. E., Subramanian, V. ja Posewitz, M. C. (2011). Improving biofuel production in phototrophic microorganisms with systems biology. *Biofuels* 2(2): 125-144.
68. Jones, M. R., Fowler, G. J. S., Gibson, L. C. D., Grief, G. G., Olsen, J. D., Crielgaard, W. ja Hunter, C. N. (1992). Mutants of *Rhodobacter sphaeroides* lacking one or more pigment-protein complexes and complementation with reaction-centre, LH1, and LH2 genes. *Molecular Microbiology* 6(9): 1173-1184.

69. Kangur, L., Leiger, K. ja Freiberg, A. (2008a). Evidence for high-pressure-induced rupture of hydrogen bonds in LH2 photosynthetic antenna pigment-protein complexes. *Journal of Physics: Conference Series* 121(11).
70. Kangur, L., Olsen, J. D., Hunter, C. N. ja Freiberg, A. (2012). Estimating hydrogen bond energy in integral membrane chromoproteins by high hydrostatic pressure optical spectroscopy. *Protein Structure* 2012: 191-212.
71. Kangur, L., Ratsep, M., Timpmann, K., Wang-Otomo, Z. Y. ja Freiberg, A. (2020). The two light-harvesting membrane chromoproteins of *Thermochromatium tepidum* expose distinct robustness against temperature and pressure. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1861(8): 148205.
72. Karadi, K., Kapetanaki, S.M., Raics, K., Pecs, I., Kapronczai, R., Fekete, Z., Iuliano, J.N., Collado, J.T., Gil, A.A., Orban, J. ja Nyitrai, M. (2020). Functional dynamics of a single tryptophan residue in a BLUF protein revealed by fluorescence spectroscopy. *Scientific Reports* 10(1): 1-15.
73. Ke, B. (2003). *Photosynthesis*. vol. 10. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
74. Kimura, Y., Lyu, S., Okoshi, A., Okazaki, K., Nakamura, N., Ohashi, A., Ohno, T., Kobayashi, M., Imanishi, M., Takaichi, S., Madigan, M. T. ja Wang-Otomo, Z. Y. (2017). Effects of calcium ions on the thermostability and spectroscopic properties of the LH1-RC complex from a new thermophilic purple bacterium *Allochromatium tepidum*. *The Journal of Physical Chemistry B* 121(19): 5025-5032.
75. Kis, M., Asztalos, E., Sipka, G. ja Maróti, P. (2014). Assembly of photosynthetic apparatus in *Rhodobacter sphaeroides* as revealed by functional assessments at different growth phases and in synchronized and greening cells. *Photosynthesis research*, 122(3): 261-273.
76. Koenig, S., Müller, L. ja Smith, D.K. (2001). Dendritic Biomimicry: Microenvironmental Hydrogen-Bonding Effects on Tryptophan Fluorescence. *Chemistry—A European Journal* 7(5): 979-986.
77. Koepke, J., Hu, X., Muenke, C., Schulten, K. ja Michel, H. (1996). The crystal structure of the light-harvesting complex II (B800–850) from *Rhodospirillum rubrum*. *Structure* 4(5): 581-597.
78. Kronberg, B., Holmberg, K. ja Lindman, B. (2014). *Surface Chemistry of Surfactants and Polymers*. vol. 1. Roots: Wiley.
79. Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. Boston: Springer.

80. Lang, H. P., Cogdell, R. J., Takaichi, S. ja Hunter, C. N. (1995). Complete DNA sequence, specific Tn5 insertion map, and gene assignment of the carotenoid biosynthesis pathway of *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Bacteriology* 177(8): 2064-2073.
81. Lee, H., Cheng, Y.C. and Fleming, G.R. (2007). Coherence dynamics in photosynthesis: protein protection of excitonic coherence. *Science* 316(5830): 1462-1465.
82. Lesch, H., Schlichter, J., Friedrich, J. ja Vanderkooi, J. M. (2004). Molecular probes: what Is the range of their interaction with the environment? *Biophysical Journal* 86(1): 467-472.
83. Loach, P. A. ja Parkes-Loach, P. S. (1995). Structure-function relationships in core light-harvesting complexes (LHI) as determined by characterization of the structural subunit and by reconstitution experiments. *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. 437-471. Dordrecht: Springer.
84. Lotte, K., Plessow, R. ja Brockhinke, A. (2004). Static and time-resolved fluorescence investigations of tryptophan analogues—a solvent study. *Photochemical & Photobiological Sciences* 3(4): 348-359.
85. Luo, S., Berges, J. A., He, Z. ja Young, E. B. (2017). Algal-microbial community collaboration for energy recovery and nutrient remediation from wastewater in integrated photobioelectrochemical systems. *Algal Research* 24: 527-539.
86. Luo, Y., Ge, M., Wang, B., Sun, C., Wang, J., Dong, Y. ja Xi, J.J. (2020). CRISPR/Cas9-deaminase enables robust base editing in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Microbial Cell Factories* 19: 1-14.
87. Luong, T. Q., Kapoor, S. ja Winter, R. (2015). Pressure—A gateway to fundamental insights into protein solvation, dynamics. *Chemphyschem* 16(17): 3555-3571.
88. Lüer, L., Carey, A.-M., Henry, S., Maiuri, M., Hacking, K., Polli, D., Cerullo, G. ja Cogdell, R. J. (2015). Elementary energy transfer pathways in *Allochrochromatium vinosum* photosynthetic membranes. *Biophysical Journal* 109(9): 1885-1898.
89. Ma, F., Kimura, Y., Yu, L. J., Wang, P., Ai, X. C., Wang, Z. Y. ja Zhang, J. P. (2009). Specific  $\text{Ca}^{2+}$ -binding motif in the LH1 complex from photosynthetic bacterium *Thermochromatium tepidum* as revealed by optical spectroscopy and structural modeling. *The FEBS journal* 276(6): 1739-1749.
90. Macpherson, A. N., Arellano, J. B., Fraser, N. J., Cogdell, R. J. ja Gillbro, T. (2001). Efficient energy transfer from the carotenoid S2 state in a photosynthetic light-harvesting complex. *Biophysical Journal* 80(2): 923-930.

91. Maddah, H.A., Berry, V. ja Behura, S.K. (2020). Biomolecular photosensitizers for dye-sensitized solar cells: Recent developments and critical insights. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 121: 109678.
92. Madigan, M. T. (1984). A novel photosynthetic purple bacterium isolated from a yellowstone hot spring. *Science*.
93. Maksimov, E.G., Protasova, E.A., Tsoraev, G.V., Yaroshevich, I.A., Maydykovskiy, A.I., Shirshin, E.A., Gostev, T.S., Jelzow, A., Moldenhauer, M., Slonimskiy, Y.B. ja Sluchanko, N.N. (2020). Probing of carotenoid-tryptophan hydrogen bonding dynamics in the single-tryptophan photoactive Orange Carotenoid Protein. *Scientific RepoRtS* 10(1): 1-12.
94. Markiewicz, B.N., Mukherjee, D., Troxler, T. ja Gai, F. (2016). Utility of 5-cyanotryptophan fluorescence as a sensitive probe of protein hydration. *The Journal of Physical Chemistry B* 120(5): 936-944.
95. McDermott, G., Prince, S. M., Freer, A. A., Hawthornthwaite-Lawless, A. M., Papiz, M. Z., Cogdell, R. J. ja Isaacs, N. W. (1995). Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* 374(6522): 517-521.
96. Meersman, F. ja McMillan, P.F. (2014). High hydrostatic pressure: a probing tool and a necessary parameter in biophysical chemistry. *Chemical Communications* 50(7): 766-775.
97. Mougiakos, I., Orsi, E., Ghiffary, M.R., Post, W., de Maria, A., Adiego-Perez, B., Kengen, S.W., Weusthuis, R.A. ja van der Oost, J. (2019). Efficient Cas9-based genome editing of *Rhodobacter sphaeroides* for metabolic engineering. *Microbial Cell Factories* 18(1): 1-13.
98. Moulisová, V., Luer, L., Hoseinkhani, S., Brotsudarmo, T. H., Collins, A. M., Lanzani, G., Blankenship, R. E. ja Cogdell, R. J. (2009). Low light adaptation: energy transfer processes in different types of light harvesting complexes from *Rhodopseudomonas palustris*. *Biophysical Journal* 97(11): 3019-3028.
99. Mune Mune, M. A., Stănciuc, N., Grigore-Gurgu, L., Aprodu, I. ja Borda, D. (2020). Structural changes induced by high pressure processing in Bambara bean proteins at different pH. *Lwt* 124.
100. Nataf, L., Rodríguez, F., Valiente, R. ja González, J. (2009). Spectroscopic and luminescence properties of (CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>NMnCl<sub>3</sub>: a sensitive Mn<sup>2+</sup>-based pressure gauge. *High Pressure Research* 29(4): 653-659.

101. Niedzwiedzki, D. M., Gardiner, A. T., Blankenship, R. E. ja Cogdell, R. J. (2018). Energy transfer in purple bacterial photosynthetic units from cells grown in various light intensities. *Photosynthesis research* 137(3): 389-402.
102. Niwa, S., Yu, L. J., Takeda, K., Hirano, Y., Kawakami, T., Wang-Otomo, Z. Y. ja Miki, K. (2014). Structure of the LH1-RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 Å. *Nature* 508(7495): 228-232.
103. Órdenes-Aenishanslins, N., Anziani-Ostuni, G., Vargas-Reyes, M., Alarcon, J., Tello, A. ja Perez-Donoso, J. M. (2016). Pigments from UV-resistant Antarctic bacteria as photosensitizers in Dye Sensitized Solar Cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 162: 707-714.
104. Overmann, J., Cypionka, H. ja Pfennig, N. (1992). An extremely low-light adapted phototrophic sulfur bacterium from the Black Sea. *Limnology and Oceanography* 37(1): 150-155.
105. Pajusalu, M., Rätsep, M., Kangur, L. ja Freiberg, A. (2019). High-pressure control of photosynthetic excitons. *Chemical Physics* 525.
106. Papiz, M.Z., Prince, S.M., Howard, T., Cogdell, R.J. ja Isaacs, N.W. (2003). The structure and thermal motion of the B800–850 LH2 complex from *Rps. acidophila* at 2.0 Å resolution and 100 K: new structural features and functionally relevant motions. *Journal of Molecular Biology* 326(5): 1523-1538.
107. Peng, H. L. ja Callender, R. (2018). Mechanism for fluorescence quenching of tryptophan by oxamate and pyruvate: conjugation and solvation-induced photoinduced electron transfer. *The Journal of Physical Chemistry B* 122(25): 6483-6490.
108. Poliak, P., Škorňa, P., Klein, E. ja Lukeš, V. (2018). Thermodynamics of radical scavenging of symmetric carotenoids and their charged species. *Food Chemistry* 268: 542-549.
109. Prince, S. M., Howard, T. D., Myles, D. A. A., Wilkinson, C., Papiz, M. Z., Freer, A. A., Cogdell, R. J. ja Isaacs, N. W. (2003). Detergent structure in crystals of the integral membrane light-harvesting complex LH2 from *Rhodopseudomonas acidophila* strain 10050. *Journal of Molecular Biology* 326(1): 307-315.
110. Ramos, F.C., Nottoli, M., Cupellini, L. ja Mennucci, B. (2019). The molecular mechanisms of light adaption in light-harvesting complexes of purple bacteria revealed by a multiscale modeling. *Chemical Science* 10(42): 9650-9662.

111. Ravi, S. K., Rawding, P., Elshahawy, A. M., Huang, K., Sun, W., Zhao, F., Wang, J., Jones, M. R. ja Tan, S. C. (2019). Photosynthetic apparatus of *Rhodobacter sphaeroides* exhibits prolonged charge storage. *Nature communications* 10(1): 902.
112. Renge, I. ja Mauring, K. (2013). Spectral shift mechanisms of chlorophylls in liquids and proteins. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 102: 301-313.
113. Ribeiro, L.F., Ribeiro, L.F., Barreto, M.Q. ja Ward, R.J. (2018). Protein engineering strategies to expand CRISPR-Cas9 applications. *International Journal of Genomics* 2018: 1652567.
114. Roche, J. ja Royer, C. A. (2018). Lessons from pressure denaturation of proteins. *Journal of The Royal Society Interface* 15(147).
115. Roche, J., Caro, J. A., Norberto, D. R., Barthe, P., Roumestand, C., Schlessman, J. L., Garcia, A. E., Garcia-Moreno, B. E. ja Royer, C. A. (2012). Cavities determine the pressure unfolding of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(18): 6945-6950.
116. Ruan, K., Lange, R., Zhou, Y. ja Balny, C. (1998). Unusual effect of high hydrostatic pressure on basic phospholipase A<sub>2</sub> from venom of *Agkistrodon Halys Pallas*. *Biochemical and biophysical research communications* 249(3): 844-848.
117. Ruan, K., Tian, S., Lange, R. and Balny, C., (2000). Pressure effects on tryptophan and its derivatives. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269(3): 681-686.
118. Saer, R. G. ja Blankenship, R. E. (2017). Light harvesting in phototrophic bacteria: structure and function. *Biochemical Journal* 474(13): 2107-2131.
119. Saga, Y. ja Hirota, K. (2016). Determination of the molar extinction coefficients of the B800 and B850 absorption bands in light-harvesting complexes 2 derived from three purple photosynthetic bacteria *Rhodoblastus acidophilus*, *Rhodobacter sphaeroides*, and *Phaeospirillum moliscihianum* by extraction of bacteriochlorophyll a. *Analytical Sciences* 32(7): 801-804.
120. Sauer, K., Cogdell, R.J., Prince, S.M., Freer, A., Isaacs, N.W. ja Scheer, H. (1996). Structure-based calculations of the optical spectra of the LH2 bacteriochlorophyll-protein complex from *Rhodospseudomonas acidophila*. *Photochemistry and Photobiology* 64(3): 564-576.

121. Scholes, G.D. (2010). Quantum-coherent electronic energy transfer: Did nature think of it first?. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 1(1): 2-8.
122. Schroeder, C. A., Caycedo-Soler, F., Huelga, S. F. ja Plenio, M. B. (2015). Optical signatures of quantum delocalization over extended domains in photosynthetic membranes. *The Journal of Physical Chemistry A* 119(34): 9043-9050.
123. Şener, M. K., Olsen, J. D., Hunter, C. N. ja Schulten, K. (2007). Atomic-level structural and functional model of a bacterial photosynthetic membrane vesicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(40): 15723-15728.
124. Şener, M., Strümpfer, J., Timney, J. A., Freiberg, A., Hunter, C. N. ja Schulten, K. (2010). Photosynthetic vesicle architecture and constraints on efficient energy harvesting. *Biophysical Journal* 99(1): 67–75.
125. Shi, Y., Zhao, N. J., Wang, P., Fu, L. M., Yu, L. J., Zhang, J. P. ja Wang-Otomo, Z. Y. (2015). Thermal adaptability of the light-harvesting complex 2 from *Thermochromatium tepidum*: temperature-dependent excitation transfer dynamics. *The Journal of Physical Chemistry B* 119(47): 14871-14879.
126. Shi, Y., Yu, J., Yu, L. J., Wang, P., Fu, L. M., Zhang, J. P. ja Wang-Otomo, Z. Y. (2017). Dependence of the hydration status of bacterial light-harvesting complex 2 on polyol cosolvents. *Photochemical and Photobiological Sciences* 16(5): 795-807.
127. Skulachev, V., Bogachev, A. V. ja Kasparinsky, F. O. (2013). *Principles of Bioenergetics*. Berliin
128. Skvarnavičius, G., Toleikis, Z., Grigaliūnas, M., Smirnovienė, J., Norvaišas, P., Cimperman, P., Matulis, D. ja Petrauskas, V. (2017). High pressure spectrofluorimetry—a tool to determine protein-ligand binding volume. *Journal of Physics: Conference Series* 950(4).
129. Soleimani Zohr Shiri, M., Henderson, W. ja Mucalo, M. R. (2019). A review of the lesser-studied microemulsion-based synthesis methodologies used for preparing nanoparticle systems of the noble metals, Os, Re, Ir and Rh. *Materials* 12(12): 1896.
130. Stetsenko, A. ja Guskov, A. (2017). An overview of the top ten detergents used for membrane protein crystallization. *Crystals* 7(7).
131. Strümpfer, J., Şener, M. ja Schulten, K. (2012). How quantum coherence assists photosynthetic light-harvesting. *The journal of physical chemistry letters* 3(4): 536-542.



132. Sturgis, J.N., Jirsakova, V., Reiss-Husson, F., Cogdell, R.J. ja Robert, B. (1995). Structure and properties of the bacteriochlorophyll binding site in peripheral light-harvesting complexes of purple bacteria. *Biochemistry* 34(2): 517-523.
133. Sturgis, J.N., Olsen, J.D., Robert, B. ja Hunter, C.N. (1997). Functions of conserved tryptophan residues of the core light-harvesting complex of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry* 36(10): 2772-2778.
134. Suzuki, H., Hirano, Y., Kimura, Y., Takaichi, S., Kobayashi, M., Miki, K. ja Wang, Z. Y. (2007). Purification, characterization and crystallization of the core complex from thermophilic purple sulfur bacterium *Thermochromatium tepidum*. *Biochim Biophys Acta* 1767(8): 1057-1063.
135. Swainsbury, D.J.K., Martin, E. C., Vasilev, C., Parkes-Loach, P. S., Loach, P. A. ja Hunter, C.N. (2017a). Engineering of a calcium-ion binding site into the RC-LH1-PufX complex of *Rhodobacter sphaeroides* to enable ion-dependent spectral red-shifting. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1858(11): 927-938.
136. Swainsbury, D.J.K., Faries, K.M., Niedzwiedzki, D.M., Martin, E.C., Flinders, A.J., Canniffe, D.P., Shen, G., Bryant, D.A., Kirmaier, C., Holten, D. ja Hunter, C.N. (2019). Engineering of B800 bacteriochlorophyll binding site specificity in the *Rhodobacter sphaeroides* LH2 antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1860(3): 209-223.
137. Syassen, K. (2008). Ruby under pressure. *High Pressure Research* 28(2): 75-126.
138. Zhang, H., Liu, H., Tian, Z., Lu, D., Yu, Y., Cestellos-Blanco, S., Sakimoto, K. K. ja Yang, P. (2018). Bacteria photosensitized by intracellular gold nanoclusters for solar fuel production. *Nature nanotechnology* 13(10): 900-905.
139. Zivcak, M., Olsovska, K. ja Brestic, M. (2017). Photosynthetic responses under harmful and changing environment: practical aspects in crop research. *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications*. 203-248. Cham: Springer.
140. Timpmann, K., Ellervee, A., Pullerits, T., Ruus, R., Sundström, V. ja Freiberg, A. (2001). Short-range exciton couplings in LH2 photosynthetic antenna proteins studied by high hydrostatic pressure absorption spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 105(35): 8436-8444.

141. van Grondelle, R., Dekker, J. P., Gillbro, T. ja Sundstrom, V. (1994). Energy transfer and trapping in photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1187(1): 1–65.
142. Vivian, J. T. ja Callis, P. R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical Journal* 80: 2093–2109.
143. Wu, H. M., Rätsep, M., Lee, I. J., Cogdell, R. J. ja Small, G. J. (1997). Exciton level structure and energy disorder of the B850 ring of the LH2 antenna complex. *The Journal of Physical Chemistry B* 101(38): 7654-7663.
144. Yadav, L. D. S. (2005). *Organic Spectroscopy*. Dordrecht: Springer.
145. Yamori, W., Hikosaka, K. ja Way, D. A. (2014). Temperature response of photosynthesis in C3, C4, and CAM plants: temperature acclimation and temperature adaptation. *Photosynthesis Research* 119(1-2): 101-117.
146. Yu, L. J., Suga, M., Wang-Otomo, Z. Y. ja Shen, J. R. (2018a). Structure of photosynthetic LH1-RC supercomplex at 1.9 Å resolution. *Nature* 556(7700): 209-213.

## Veebisaidid ja andmebaasid

Encyclopædia Britannica Inc. Kasutatud 11.05.2020. [www.britannica.com](http://www.britannica.com)

RCSB Protein Data Bank. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. ja Bourne, P. E. (2000). RCSB Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28: 235-242. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)

Sugioka, M., 2009. The relationship between UV-VIS absorption and structure of organic compounds. *UV Talk Letter February. Shimadzu*, 2:5-6. [www.shimadzu.com](http://www.shimadzu.com)

The UniProt Consortium. Järjestused - *Rba. sphaeroides* (*pucA*, Q3J144; *pucB*, P0C0Y2), *Tch. tepidum* (*pucA1*, C7G4C7; *pucA2*, C7G4C9; *pucA3*, C7G526; *pucB1*, C7G4C6; *pucB2*, C7G4C8; *pucB3*, C7G525) [www.uniprot.org](http://www.uniprot.org).

## Joonised

©TÜFI biofüüsika labor. Topoloogiline kujutis detergendi mitselist, publitseerimata materjal. <http://utbiophys.eu>

©TÜFI biofüüsika labor. *Rba. sphaeroides* spektri illustratsioon, osaliselt publitseerimata materjal. <http://utbiophys.eu>

## Tarkvara

Microcal Origin 6, v. 6.0. Northampton, MA, USA: Microcal Software Inc.

OriginPro 2017, v. 9.4. Northampton, MA, USA: OriginLab Corporation.

## Lisa 1. Fluorestseeruvad aminohappejäägid LH2 polüpeptiidides

**Tabel 2. A. LH2 fluorstseeruvad aminohappejäägid *Rba. sphaeroides* ning *Tch. tepidum* LH2  $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidide järjestuses (Trp, W; Phe F; Tyr, Y) (Uniprot).**

|                        |  |
|------------------------|--|
| <i>Rba.</i> $\alpha_1$ | MASLSGLTDQ QAKE <b>F</b> HEQ <b>F</b> K VT <b>Y</b> TAF <b>V</b> GLA ALAHL <b>L</b> VIAA NP <b>W</b> <b>W</b>  |
| $\alpha_2$             | MNNSKM <b>W</b> LT <b>V</b> NPNLGVPL <b>L</b> L GSVAVASLVV HGAVLTT <b>T</b> P <b>W</b> IAN <b>Y</b> <b>Y</b> Q <b>G</b> SEP<br><b>W</b> PVAAAPAE <b>E</b>  |
| <i>Rba.</i> $\beta_1$  | MTDDL <b>N</b> K <b>V</b> WP SGLTVAEAE <b>E</b> VHKQLILG <b>T</b> R V <b>F</b> GGMALIA <b>H</b> <b>F</b> LAAAATP <b>W</b> L G  |
| $\beta_2$              | MTDDPK <b>K</b> VWP SGLTIAEAE <b>E</b> VHKQLILG <b>T</b> R V <b>F</b> GGMALIA <b>H</b> <b>F</b> LAAAATP <b>W</b> L G   |
| <i>Tch.</i> $\alpha_1$ | MTIE <b>F</b> MG <b>Y</b> KP LEND <b>Y</b> K <b>F</b> W <b>L</b> V VNPAT <b>W</b> L <b>I</b> PT LIAVALTAVL VHIVA <b>F</b> G <b>L</b> EG<br>Q <b>G</b> W <b>H</b> APAA <b>A</b> AVEAAPAA <b>Q</b> |
| $\alpha_2$             | MSDVAKPRNP EDD <b>W</b> K <b>I</b> W <b>L</b> VV NPAT <b>W</b> LM <b>P</b> I <b>F</b> <b>Y</b> AVLVLAIAV HAVV <b>F</b> SVGLG <b>W</b> <b>Q</b>   |
| $\alpha_3$             | MSNVAKPRNP EDD <b>W</b> K <b>I</b> W <b>L</b> VV NPAT <b>W</b> LM <b>P</b> I <b>F</b> <b>Y</b> ALLVLAIAV HAVV <b>F</b> SVGLG <b>W</b> <b>K</b>   |
| <i>Tch.</i> $\beta_1$  | MAETKSLSGL TEQQAKE <b>F</b> HE <b>Q</b> <b>F</b> KTT <b>Y</b> TAF <b>V</b> GLAALAHLLV IAANP <b>W</b> <b>W</b>  |
| $\beta_2$              | MAEQSLSGLT EQQAKE <b>F</b> HEQ <b>F</b> KTT <b>Y</b> TAF <b>V</b> S LAALAHLLVI AANP <b>W</b> <b>W</b>  |
| $\beta_3$              | MASLSGLTDQ QAKE <b>F</b> HEQ <b>F</b> K VT <b>Y</b> TAF <b>V</b> GLA ALAHL <b>L</b> VIAA NP <b>W</b> <b>W</b>  |

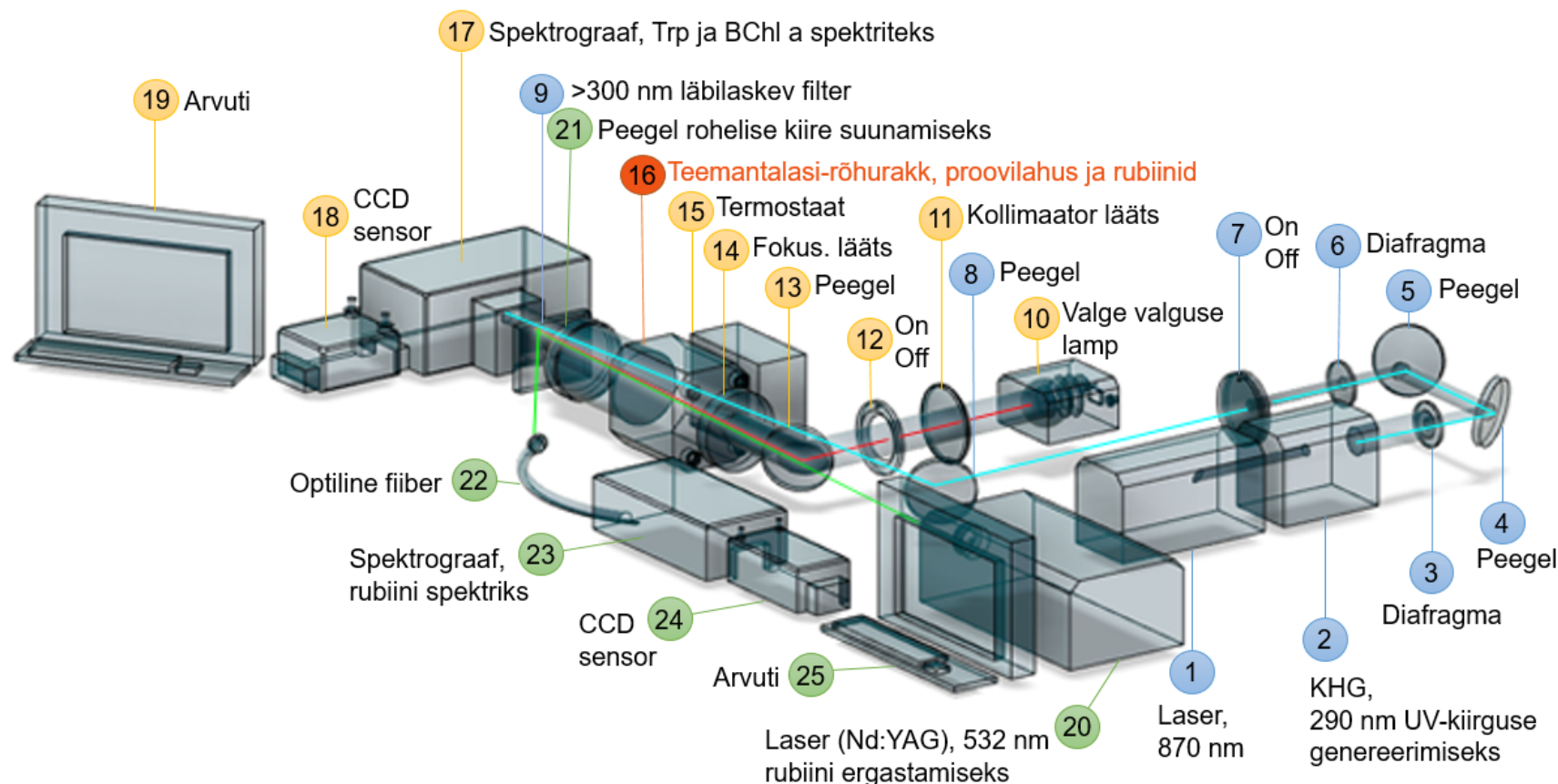
**B. Teadaolevad Trp (W) kiirguse kustutajad (Q,G,E,D,C,H,K,Y; Ghisaidoobe ja Chung, 2014).**

|                        |  |
|------------------------|--|
| <i>Rba.</i> $\alpha_1$ | MASLS <b>G</b> L <b>T</b> D <b>Q</b> QAKE <b>F</b> HEQ <b>F</b> K VT <b>Y</b> TAF <b>V</b> <b>G</b> LA ALA <b>H</b> LLVIAA NP <b>W</b> <b>W</b>  |
| $\alpha_2$             | MNNS <b>K</b> M <b>W</b> LT <b>V</b> NPNL <b>G</b> VPL <b>L</b> L <b>G</b> SVAVASLVV <b>H</b> GAVLTT <b>T</b> P <b>W</b> IAN <b>Y</b> <b>Y</b> Q <b>G</b> SE <b>P</b><br><b>W</b> PVAAAPAE <b>E</b>                      |
| <i>Rba.</i> $\beta_1$  | MT <b>D</b> D <b>L</b> <b>N</b> K <b>V</b> WP SGLTVAEAE <b>E</b> VHKQLIL <b>G</b> T <b>R</b> V <b>F</b> <b>G</b> GMALIA <b>H</b> <b>F</b> LAAAATP <b>W</b> L <b>G</b>  |
| $\beta_2$              | MT <b>D</b> D <b>P</b> <b>K</b> <b>K</b> VWP SGLTIAEAE <b>E</b> VHKQLIL <b>G</b> T <b>R</b> V <b>F</b> <b>G</b> GMALIA <b>H</b> <b>F</b> LAAAATP <b>W</b> L <b>G</b>   |
| <i>Tch.</i> $\alpha_1$ | MTIE <b>F</b> FM <b>G</b> <b>Y</b> KP LEND <b>Y</b> K <b>F</b> W <b>L</b> V VNPAT <b>W</b> L <b>I</b> PT LIAVALTAVL V <b>H</b> IVAF <b>G</b> <b>L</b> EG<br><b>Q</b> <b>G</b> W <b>H</b> APAA <b>A</b> AVEAAPAA <b>Q</b> |
| $\alpha_2$             | MS <b>D</b> VAKPRNP EDD <b>W</b> K <b>I</b> W <b>L</b> VV NPAT <b>W</b> LM <b>P</b> I <b>F</b> <b>Y</b> AVLVLAIAV HAVV <b>F</b> SV <b>G</b> L <b>G</b> <b>W</b> <b>Q</b>   |
| $\alpha_3$             | MSNVAKPRNP EDD <b>W</b> K <b>I</b> W <b>L</b> VV NPAT <b>W</b> LM <b>P</b> I <b>F</b> <b>Y</b> ALLVLAIAV HAVV <b>F</b> SV <b>G</b> L <b>G</b> <b>W</b> <b>K</b>  |
| <i>Tch.</i> $\beta_1$  | MA <b>E</b> T <b>K</b> SLSGL TEQQAKE <b>F</b> HE <b>Q</b> <b>F</b> KTT <b>Y</b> TAF <b>V</b> GLAALAHLLV IAANP <b>W</b> <b>W</b>  |
| $\beta_2$              | MA <b>E</b> Q <b>S</b> LSGLT <b>E</b> QQAKE <b>F</b> HEQ <b>F</b> KTT <b>Y</b> TAF <b>V</b> S LAALAHLLVI AANP <b>W</b> <b>W</b>  |
| $\beta_3$              | MASLS <b>G</b> L <b>T</b> D <b>Q</b> QAKE <b>F</b> HEQ <b>F</b> K VT <b>Y</b> TAF <b>V</b> <b>G</b> LA ALA <b>H</b> LLVIAA NP <b>W</b> <b>W</b>  |

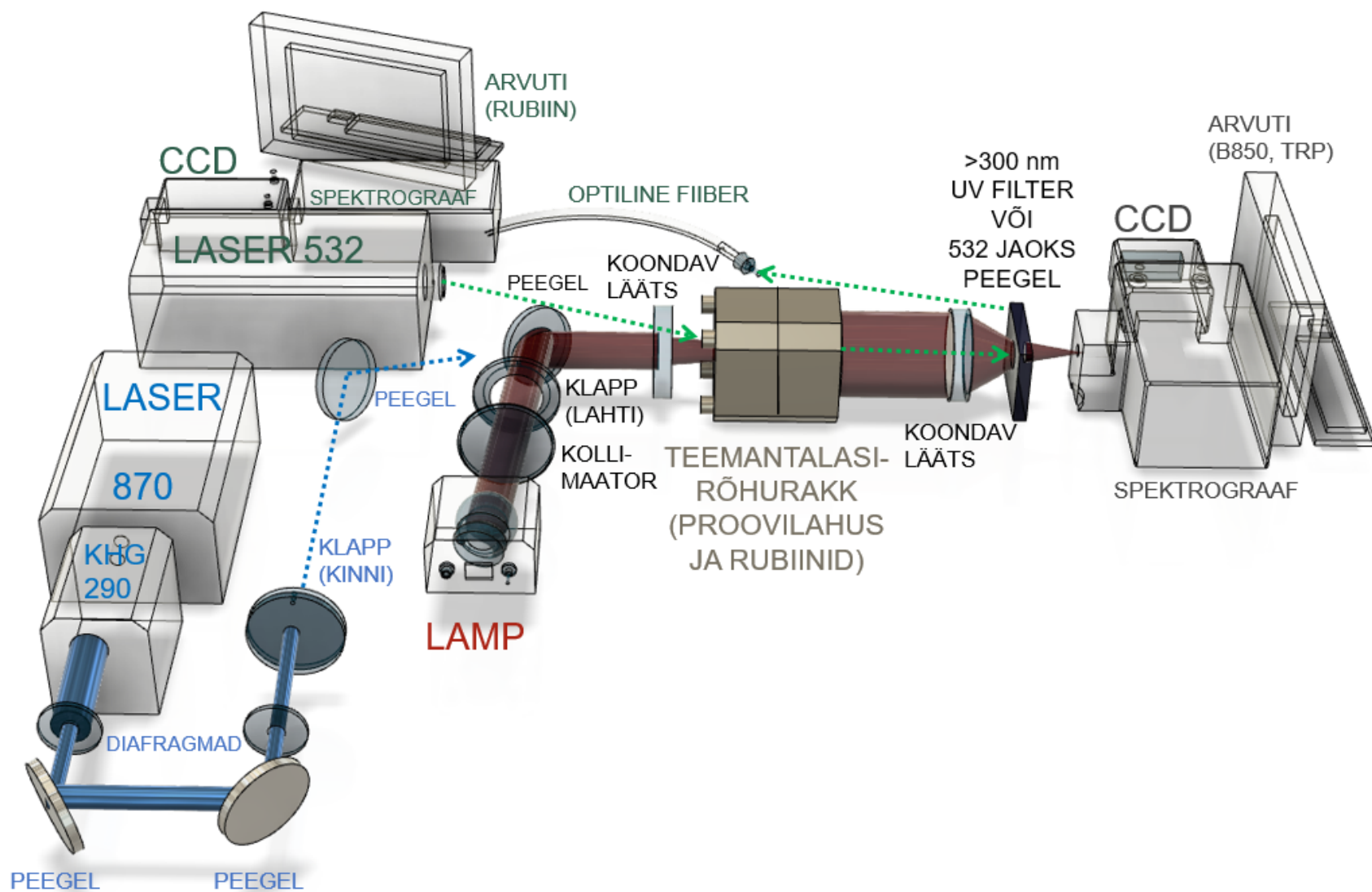
**Tabel 3.** Valguahela siseste fluorofooride võimalikud arvud ühes LH2 antennkompleksis töös uuritud kahe liigi puhul, ülemine tabel sisaldab *Rba. sphaeroides* teadaolevat alleelide infot ( $\alpha$ - ja  $\beta$ -polüpeptiidil on teada kaks alleelivarianti kummastki) ning alumises tabeli osas on toodud *Tch. tepidum* teadaoleva kolme alleeli info. Üks subühik moodustub ühest  $\alpha$ - ja ühest  $\beta$ -polüpeptiidi alleelist, sealjuures *Rba. sphaeroides* LH2 koosneb 9 subühikust. *Tch. tepidum* 8 subühikust koosneva analoogse LH2 kompleksi mudel on esitatud (Joonis 2; lk 13) ning *Rba. sphaeroides* analoogse LH2 antenni valgu fluorofoori ja kompleksi ligandi (B850 bakterklorofüllil) vahel moodustuva vesiniksideme illustratsioon (Joonis 7, lk 23). (Koepeke jt., 1996; Papiz jt., 2003; Uniprot)

| Bakter, valk, geen, Uniprot ID                               | Trp, W | Phe, F | Tyr, Y | Kokku   |
|--|--------|--------|--------|---------|
| <i>Rba.</i> , $\alpha_1$ -polüpeptiid, <i>puc1A</i> , Q3J144 | 2      | 1      | 2      | 5       |
| <i>Rba.</i> , $\alpha_2$ -polüpeptiid, <i>puc2A</i> , Q3J684 | 3      | 1      | 4      | 8       |
| <i>Rba.</i> , $\beta_1$ -polüpeptiid, <i>puc1B</i> , P0C0Y2  | 2      | 2      | 2      | 6       |
| <i>Rba.</i> , $\beta_2$ -polüpeptiid, <i>puc2B</i> , Q3J685  | 2      | 0      | 2      | 4       |
| Ühes $\alpha\beta$ subühikus kokku:                          | 4-5    | 1-3    | 4-6    | 11-12   |
| Nonameerses LH2 kompleksis kokku:                            | 36-40  | 9-27   | 36-54  | 99-108  |
| <i>Tch.</i> , $\alpha_1$ -polüpeptiid, <i>puc1A</i> , C7G4C7 | 3      | 3      | 2      | 8       |
| <i>Tch.</i> , $\alpha_2$ -polüpeptiid, <i>puc2A</i> , C7G4C9 | 4      | 2      | 1      | 7       |
| <i>Tch.</i> , $\alpha_3$ -polüpeptiid, <i>puc3A</i> , C7G526 | 4      | 2      | 1      | 7       |
| <i>Tch.</i> , $\beta_1$ - polüpeptiid, <i>puc1B</i> C7G4C6   | 2      | 3      | 1      | 6       |
| <i>Tch.</i> , $\beta_2$ -polüpeptiid, <i>puc2B</i> C7G4C8    | 2      | 3      | 1      | 6       |
| <i>Tch.</i> , $\beta_3$ -polüpeptiid, <i>puc3B</i> C7G525    | 2      | 3      | 1      | 6       |
| Ühes $\alpha\beta$ subühikus kokku:                          | 5-6    | 5-6    | 2-3    | 13-14   |
| Oktameerses LH2 kompleksis kokku:                            | 40-48  | 40-48  | 16-24  | 104-112 |

## Lisa 2. Barospektroskoopiline seade



**Joonis 25.** Katse jooksul kasutusel olevad kolm erinevat optilise spektroskoopia mõõteseadete gruppi, mis kates on ühendatud sama prooviga ja on katse ühe rõhuastme ajal vaheldumisi kasutusel. Helesinine joon ühendab proovi trüptofaani (Trp) UV fluorestsentsi mõõtmise seadet (1-9). Punane joon ühendab BChl a infrapuna neeldumise mõõtmise seadet (10-19). Roheline joon ühendab rubiini luminesentsi mõõtmise seadet, mis on vajalik rõhu võimalikult täpse väärtuse määramiseks (20-25). Osa seadme komponentidest on kasutusel mitme spektri mõõtmises – 14, 15, 16, 17, 18, 19. Uuritav proovilahus koos rubiinidega asub teemantalasi-rõhuraku ~300-nanoliitrise mahutavusega rõhukambris (16), millest suunatakse vaheldumisi läbi kõik valgusallikate rajad. Valguskiire suunamiseks kasutatakse peegleid (4, 5, 8, 13, 21), kiirte joondamiseks kollimeerivaid läätsi (11), koondamiseks fookuseerivat lääts (14) ning kiire diameetri reguleerimiseks muudetava avaga diafragmaid (3, 5). Valgusallikate radade välja/sisse lülitamiseks kasutatakse tõstetava klapi vāravaid (7, 12). Spektrid registreeritakse spektragraafide (17, 23) ja CCD anduritega (18, 24), mille abil on võimalik footoneid elektrooniliselt detekteerida.



Joonis 26. Seadme täpsustused.

### **Lisa 3. Lihtlitsents**

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Silja Erg,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

„Fotosünteesiliste kromoproteiinide uuring kõrge hüdrostaatilise rõhu all kasutades valguomaseid optilisi markereid“,

mille juhendajad on professor Arvi Freiberg, teadur Liina Kangur ja vanemteadur Kõu Timpmann,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Silja Erg*

12.08.2020